

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



**EVALUACIÓN DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y L50B)
DE “ENTEROCOCCUS FAECIUM” L50 COMO
BIOCONSERVANTE DE LA CERVEZA: PRODUCCIÓN Y
SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LAS ENTEROCINAS
L50 Y L50B EN “SCCHAROMYCES CEREVISIAE” Y
“PICHIA PASTORIS”**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Antonio Basanta Díaz

Bajo la dirección de los doctores
Luis M. Cintas Izarra y Pablo E. Hernández Cruza

Madrid, 2009

• **ISBN: 978-84-692-0997-4**

©Antonio Basanta Díaz, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**EVALUACIÓN DE LA ENTEROCINA L50 (L50A
Y L50B) DE *Enterococcus faecium* L50 COMO
BIOCONSERVANTE DE LA CERVEZA.
PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA
DE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B EN
Saccharomyces cerevisiae Y *Pichia pastoris***

TESIS DOCTORAL

ANTONIO BASANTA DÍAZ

Madrid, 2007

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

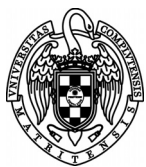
**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**EVALUACIÓN DE LA ENTEROCINA L50 (L50A
Y L50B) DE *Enterococcus faecium* L50 COMO
BIOCONSERVANTE DE LA CERVEZA.
PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA
DE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B EN
Saccharomyces cerevisiae Y *Pichia pastoris***

Memoria que, para optar al título de Doctor con mención honorífica de
“Doctorado Europeo”, presenta el Licenciado
Antonio Basanta Díaz

Madrid, septiembre de 2007



DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

LUIS M. CINTAS IZARRA Y PABLO E. HERNÁNDEZ CRUZA, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR Y CATEDRÁTICO, RESPECTIVAMENTE, DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Evaluación de la enterocina L50 (L50A y L50B) de *Enterococcus faecium* L50 como bioconservante de la cerveza. Producción y secreción heteróloga de las enterocinas L50A y L50B en *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris***”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. Antonio Basanta Díaz, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “Doctorado Europeo”.

Madrid, 25 de septiembre de 2007

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Luis M. Cintas Izarra

Pablo E. Hernández Cruza

A mis padres, Antonio y Milagros

A mi hermana, Silvia

A mi abuelo, Jesús

A mis abuelas, Memi y Nieves

A Sandra

La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia

Sócrates

Daría todo lo que sé, por saber la mitad de lo que ignoro

Descartes

Quisiera dar las gracias a todas las personas que habéis permitido, participado o contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral, así como a todas aquellas a las que he tenido la oportunidad de conocer durante los más de cinco años dedicados a este trabajo de investigación.

Al Director del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Lorenzo de la Hoz, por aceptarme en este Departamento y por la colaboración y amabilidad mostrada a lo largo de estos años.

Me gustaría expresar mi gratitud de manera especial a mis directores de tesis, Luis M. Cintas Izarra y Pablo E. Hernández Cruza, por haberme aceptado en su grupo de investigación, por confiar en mí desde el primer momento y por la ayuda que me habéis ofrecido durante la realización de este trabajo. A Luis Cintas, director y tutor de esta Tesis Doctoral, por su dedicación y por sus brillantes e inagotables ideas. Muchas gracias Luis por tu inestimable y continua ayuda durante la realización de este trabajo, así como durante la escritura de esta Tesis Doctoral. Sin tu trabajo y dedicación, la realización de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible. A Pablo Hernández, por su tiempo y constante disponibilidad, por transmitirme el entusiasmo necesario para que el trabajo siguiera siempre adelante, así como por sus comentarios jocosos al final de cada una de las interminables y duras jornadas de trabajo, de los que guardo un grato recuerdo.

A todos los demás miembros del Departamento que han compartido conmigo todo este tiempo, en especial a Carmen Herranz, por su amabilidad y por su ayuda durante la realización de los últimos experimentos de este trabajo, así como durante la escritura de esta Tesis Doctoral.

A todos mis compañeros del laboratorio “punto LAB”. A Bea y Jorge Sánchez (alias “los Bombitas”), compañeros de trabajo desde el inicio de esta Tesis Doctoral y con los que he compartido momentos inolvidables. Gracias a los dos por vuestra continua y desinteresada ayuda, por nuestras interesantes conversaciones a últimas horas de la tarde y por intentar alegrarme aquellos días en los que yo estaba de muy mal humor, especialmente durante el famoso “mes de las llaves” (la broma que me gastasteis la recordaré siempre), simplemente sé que me llevo dos amigos. Gracias Jorge por tu compañía durante nuestra estancia en Noruega, aunque siempre estábamos quejandonos de los noruegos y de sus costumbres, al final, la experiencia fue muy positiva desde el punto de vista personal y profesional. A María, por tus conocimientos y constante ayuda, así como por todos los buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio. Gracias por confiar en mí y convencer a tu nueva jefa de que yo era la persona indicada para trabajar contigo y con Belén, muchas gracias a las dos. A Jorge Gutiérrez, por tu paciencia y enseñanzas durante mis primeros pasos en el laboratorio, parecía que iba a ser imposible clonar el “factor- α ” pero al final pudimos conseguirlo. A Raquel y Rosanna, por su compañerismo. A Juan, por los buenos momentos que hemos pasado en el laboratorio cuando tú estabas empezando y yo terminaba mis últimos experimentos. A las nuevas incorporaciones, Loreto, Juanjo, Cristina y Natalia, no he podido conocerlos mucho pero se nota que sois buena gente, ánimo y disfrutad de la Tesis mientras podáis.

Me gustaría agradecer al resto de becarios del Departamento, especialmente a los de la “planta de arriba” (antiguos y contemporáneos), su ayuda prestada durante todos estos años, así como por crear un buen ambiente en el que era fácil convivir e, incluso, llegar a divertirse mientras realizabas tus experimentos y preparabas las prácticas para los alumnos. No quería destacar a ninguna persona aunque considero justo dar las gracias a Belén, por preocuparse constantemente por mí durante estos últimos meses y ayudarme a conseguir trabajo (junto con María), espero no defraudaros a las dos y que en esta nueva etapa nos los pasemos igual o mejor que en el Departamento.

I would like to thank Ingolf F. Nes for accepting me in his research laboratory (Laboratory of Microbial Gene Technology, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway) and for always trying to make my stay the most enjoyable. To Ingolf and Dzung B. Diep for supervising my research work during my stay, for their teachings, and for the help given at every moment. Thank to May, Linda, Zhian, Brede, Helge and to everybody working at LMG. Tusen tak!

A todos los compañeros que conocí durante mi estancia en Noruega, en especial a mis amigos españoles Antonio, Nem y Andrés, y chilenos Katty y Fernando, que hicieron mi estancia más agradable y llevadera. Menuda cena preparamos, con productos típicos de cada región y país, para despedirnos antes de que regresáramos a España por Navidad. Siempre recordaré nuestro viaje “relámpago” en barco (“Drunk Boat”) al norte de Dinamarca y las locuras que hicimos durante las tres semanas en que todo estaba nevado.

A la empresa Font Salem, y de manera especial a Manuel Amat y Felisa Bartolomé, ya que me permitieron realizar una visita a sus instalaciones y, por ello, conocer exhaustivamente el proceso de elaboración de la cerveza mediante la realización de un curso, así como por habernos suministrado mosto y cerveza en varias ocasiones. Asimismo, me gustaría dar las gracias a Pedro Pablo Rodríguez por enseñarme todas las instalaciones y resolverme todas las dudas que me surgieron durante mi visita a la fábrica de cerveza, así como durante la realización de este trabajo en nuestro laboratorio.

I would also like to thank Anne Vaughan and Douwe Van Sinderen (Department of Microbiology, University College Cork, National University of Ireland, Cork, Ireland) for kindly providing us with a number of beer-spoilage lactic acid bacteria strains.

Igualmente, quisiera agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la concesión de un contrato durante el año 2003 con cargo al Proyecto AGL2000-0707, así como a la Dirección General de Universidades e Investigación de la Conserjería de Educación de la Comunidad de Madrid la concesión de la beca predoctoral de Formación de Personal Investigador y la ayuda para la estancia realizada en Ås, que han contribuido muy positivamente en mi formación científica y humana. Asimismo, el trabajo realizado ha sido posible gracias a los fondos concedidos por la Fundación Danone/Complutense (Proyecto PR248/02-11688), por el Grupo Santander Central Hispano (PR41/06-15051), por la Comunidad de Madrid (Proyecto S-0505/AGR/0265) y por el Ministerio de Educación y Ciencia (Proyectos AGL2003-01508 y AGL2006-01042).

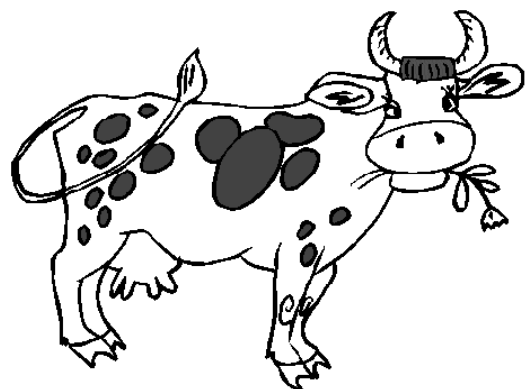
A Ángel Sainz, Elvira López y Elena Galiana, de la empresa TRAGSEGA, por confiar en mí y darme la oportunidad de comenzar mi etapa profesional en el mundo de la empresa privada. A María y Belén por todo lo que me estáis enseñando, y a mis nuevos compañeros Maia, Nerea, Rafa y Susana.

A mis amigos Vitoria, Héctor, Benja, Laura, Mari, Aflu, David, Pocho, Keko, Trufo, Montse, Yoli..., por estar siempre ahí, por haber escuchado mis problemas, por ayudarme a intentar solucionarlos y por creer en mí, aunque al principio no entendierais que hacía un Veterinario trabajando con cerveza. Vitoria, gracias por tu visita a Noruega, por los viajes que hicimos en esos diez días y por traerme y dejarme provisiones de comida y bebida.

Gracias a toda mi familia por ayudarme y entenderme en todo momento y por estar siempre ahí. Gracias a mis primas Araceli y Ana por hacerme una visita en Noruega, aunque casi no os viera, fue muy gratificante ver a mi gente. De manera especial, me gustaría dar las gracias a mi abuelo Jesús, que aunque se nos fue cuando yo empezaba este trabajo, espero que supiera que uno de sus nietos iba a llegar a ser Doctor algún día (dónde quieras que estés “no te

olvidamos”), y a mis abuelas Meme y Nieves, por su cariño durante toda mi vida y por defenderme siempre cuando de pequeño hacía algo mal, además, gracias a mi abuela de Galicia (Nieves) por haberme transmitido cuando era un niño el cariño que tu tenías a los animales, en especial a las vacas (mi querida vaca “Pasiega”), sin ello seguramente no hubiera sido Veterinario ni hubiera llegado a ser Doctor. Gracias de nuevo a los tres. Gracias a mi hermana Silvia y a mi cuñado Álvaro, por haber creído en mí y estar orgullosa de tú hermano pequeño, aunque seamos muy distintos sabes que siempre estaré para lo que os haga falta, y a ver si de una vez me hacéis tío. Por último, pero para mí más importante, me gustaría resaltar el importante papel que han tenido en este trabajo Sandra y mis padres. Gracias Sandra por apoyarme y ayudarme siempre que tenía un problema, por acompañarme numerosas tardes al laboratorio porque tenía que dar algún “pase” o ver alguna placa, así como por comprender que algún fin de semana no fuera a Valencia ya que tenía que terminar algún experimento, simplemente gracias por estar ahí. Gracias a mis padres, Antonio y Milagros, sin vosotros nunca hubiera llegado a ser lo que soy, gracias por vuestro sacrificio y apoyo durante todos los años, por la educación que me habéis dado, por vuestra paciencia conmigo, sobre todo por mi mal genio en general, pero especialmente durante la época de exámenes y durante la escritura de este trabajo, por todo ello, habéis conseguido una de las ilusiones de vuestra vida: que vuestros hijos estudiaran y tuvieran una carrera y, en mi caso, llegara a ser Doctor. MUCHAS GRACIAS POR TODO.

Espero no haberme olvidado de nadie y, por si fuera así, gracias a todos los compañeros, amigos y familiares que han contribuido a que llegue este feliz día.



ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	7
 Capítulo I/Chapter I	
EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR: OBJETIVOS	13
GENERAL ACCOUNT OF THE RESEARCH SUBJECT: OBJECTIVES	17
 Capítulo II	
INTRODUCCIÓN	21
II.1. LA CERVEZA	23
II.1.1. DEFINICIÓN, ETIMOLOGÍA E HISTORIA	23
II.1.2. CONSUMO Y PRODUCCIÓN DE CERVEZA EN ESPAÑA	25
II.1.3. MATERIAS PRIMAS Y ADITIVOS DE LA CERVEZA	26
II.1.3.1. CEBADA	26
II.1.3.2. ADJUNTOS	27
II.1.3.2.1. Adjuntos sólidos	27
II.1.3.2.1.1. Maíz	27
II.1.3.2.1.2. Arroz	27
II.1.3.2.1.3. Sorgo	28
II.1.3.2.1.4. Trigo	28
II.1.3.2.1.5. Cebada	28
II.1.3.2.1.6. Otros	28
II.1.3.2.2. Adjuntos líquidos	28
II.1.3.3. LÚPULO	28
II.1.3.4. LEVADURA CERVECERA	30
II.1.3.5. AGUA	32
II.1.3.6. ADITIVOS	34
II.1.4. ELABORACIÓN DE LA CERVEZA	35
II.1.4.1. MALTEADO	36
II.1.4.1.1. Remojo	36
II.1.4.1.2. Germinación	37
II.1.4.1.3. Secado	37
II.1.4.2. PRODUCCIÓN DEL MOSTO CERVECERO	37
II.1.4.2.1. Molienda	38
II.1.4.2.2. Maceración	38

II.1.4.2.3. Filtración	40
II.1.4.2.4. Ebullición	40
II.1.4.2.5. Clarificación, enfriamiento y aireación	41
II.1.4.3. FERMENTACIÓN	41
II.1.4.4. PROCESOS FINALES	42
II.1.4.4.1. Maduración o guarda	42
II.1.4.4.2. Filtración y clarificación	43
II.1.4.4.3. Envasado y tratamiento higienizante	43
II.1.5. TIPOS DE CERVEZA	44
II.1.6. FACTORES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA CERVEZA	46
II.1.7. ALTERACIONES DE LA CERVEZA DURANTE SU ELABORACIÓN Y ALMACENAMIENTO	48
II.1.7.1. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	50
II.1.7.1.1. Género <i>Lactobacillus</i>	51
II.1.7.1.2. Género <i>Pediococcus</i>	51
II.1.7.1.3. Otras bacterias Gram-positivas	52
II.1.7.2. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM- NEGATIVAS	52
II.1.7.2.1. Género <i>Pectinatus</i>	53
II.1.7.2.2. Género <i>Megasphaera</i>	53
II.1.7.2.3. Otras bacterias Gram-negativas	53
II.1.7.3. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LEVADURAS SALVAJES	55
II.1.8. CONTROL DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN CERVECERÍA	56
II.1.8.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	57
II.1.8.1.1. Medios de cultivo para la detección de bacterias lácticas.....	57
II.1.8.1.2. Medios de cultivo para la detección de <i>Pectinatus</i> spp. y <i>Megasphaera</i> spp.	58
II.1.8.1.3. Medios de cultivo para la detección de otras bacterias	58
II.1.8.1.4. Medios de cultivo para la detección de levaduras salvajes	58
II.1.8.2. MÉTODOS GENÉTICOS E INMUNOQUÍMICOS	59
II.1.8.2.1. Técnicas basadas en la detección directa de los microorganismos	59
II.1.8.2.2. Técnicas basadas en la detección directa de subproductos o de modificaciones en el medio debidas a la actividad de los microorganismos	60
II.1.8.2.3. Técnicas basadas en la detección de determinados componentes celulares	60
II.1.8.2.3.1. Técnicas inmunoquímicas	60
II.1.8.2.3.2. Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos	60

II.1.8.2.3.3. Técnica basada en la bioluminometría	61
II.2. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL: BACTERIOCINAS	62
II.2.1. PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL	62
II.2.2. BACTERIOCINAS	63
II.2.2.1. DEFINICIÓN	63
II.2.2.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM- NEGATIVAS vs. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS	64
II.2.2.2.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas	64
II.2.2.2.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas	67
II.2.2.3. BACTERIOCINAS vs. ANTIBIÓTICOS	67
II.2.2.4. APLICACIONES DE LAS BACTERIOCINAS	69
II.2.2.4.1. Industria alimentaria	69
II.2.2.4.2. Otras aplicaciones	69
II.3. BACTERIAS LÁCTICAS	72
II.3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS	72
II.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	73
II.3.3. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS	74
II.3.3.1. BACTERIAS LÁCTICAS Y ALIMENTOS	74
II.3.3.1.1. Aspectos negativos de la presencia de bacterias lácticas en los alimentos	75
II.3.3.2. BACTERIAS LÁCTICAS Y SALUD	76
II.3.3.2.1. Bacterias lácticas como cultivos probióticos	76
II.3.3.2.2. Bacterias lácticas como vacunas orales	77
II.3.3.2.3. Bacterias lácticas como productoras de sustancias nutraceuticas	78
II.3.3.3. BACTERIAS LÁCTICAS Y ENFERMEDAD	78
II.3.4. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS	79
II.3.4.1. CLASIFICACIÓN	79
II.3.4.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTRUCTURA	82
II.3.4.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA	83
II.3.4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN	84
II.3.4.5. PURIFICACIÓN	85
II.3.4.6. MODO DE ACCIÓN	87
II.3.4.7. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS	90
II.3.4.7.1. Gen(es) estructural(es)	91
II.3.4.7.2. Gen(es) de inmunidad	92

II.4.3.3. ASPECTOS NEGATIVOS DE LA PRESENCIA DE ENTEROCOCOS EN LOS ALIMENTOS	125
II.4.3.3.1. Enterococos como microorganismos indicadores de contaminación fecal	125
II.4.3.3.2. Enterococos como microorganismos alterantes de los alimentos.....	126
II.4.3.3.3. Enterococos como microorganismos productores de aminas biógenas	126
II.4.3.3.4. Enterococos como microorganismos patógenos	126
II.4.4. BACTERIOCINAS (ENTEROCINAS) PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS DEL GÉNERO <i>Enterococcus</i>	127
II.4.4.1. ENTEROCINAS PRODUCIDAS POR <i>Enterococcus faecium</i> L50	131
II.4.4.1.1. Enterocina L50 (L50A y L50B)	132
II.4.4.1.2. Enterocina P	136
II.4.4.1.3. Enterocina Q	137
II.4.4.1.4. Utilización de las enterocinas producidas por <i>Enterococcus faecium</i> L50 como bioconservantes de los alimentos	139
II.5. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN PROCARIOTAS Y LEVADURAS	139
II.5.1. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN PROCARIOTAS	140
II.5.1.1. SISTEMA DE TRANSPORTE DEL TIPO ABC O SISTEMA DE TRANSPORTE DEDICADO.....	140
II.5.1.2. SISTEMA Sec	143
II.5.1.2.1. Péptido y peptidasa señal	144
II.5.1.2.2. Proteína de reconocimiento SecB	145
II.5.1.2.3. SecA	145
II.5.1.2.4. Translocasa: complejo de membrana	146
II.5.1.2.5. Mecanismo de translocación proteica	146
II.5.2. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN LEVADURAS	147
II.6. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS	149
II.6.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS EN LEVADURAS	153

Capítulo III/Chapter III

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Enterococcus faecium* L50, UNA CEPA PRODUCTORA DE LAS ENTEROCINAS L50 (L50A Y L50B), P Y Q, FRENTE A BACTERIAS LÁCTICAS ALTERANTES DE LA CERVEZA EN MEDIO DE CULTIVO, MOSTO DE CERVEZA (CON Y SIN LÚPULO) Y CERVEZAS CON Y SIN ALCOHOL

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF Enterococcus faecium L50, A STRAIN PRODUCING ENTEROCINS L50 (L50A AND L50B), P AND Q, AGAINST BEER-SPOILAGE LACTIC ACID BACTERIA IN BROTH, WORT (HOPPED AND UNHOPPED), AND ALCOHOLIC AND NON-ALCOHOLIC LAGER BEERS 157

III.1. ABSTRACT 159

III.2. INTRODUCTION 159

III.3. MATERIALS AND METHODS 162

III.3.1. Bacterial strains, brewing substrates and culture conditions 162

III.3.2. Bacteriocin activity assays 162

III.3.3. Generation of bacteriocin resistant mutants of the beer-spoilage strain P. damnosus CECT4797 164

III.3.4. In vitro transcription/translation of enterocin L50A (entL50A) and enterocin L50B (entL50B) structural genes separately and together 165

III.3.5. PCR detection of potential virulence factors 165

III.3.6. Gelatinase and hemolysin production, and antibiotic susceptibility testing 166

III.3.7. Growth, survival and production of Enterococcus faecium L50 bacteriocins in wort (hopped and unhopped) and alcoholic and non-alcoholic lager beers 166

III.3.8. Effect of Enterococcus faecium L50 bacteriocins on the viability of beer-spoilage LAB in MRS broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers 167

III.3.9. Enterocin L50 (L50A and L50B) stability during the brewing process and storage 167

III.4. RESULTS 168

III.4.1. Comparative antimicrobial activity of six bacteriocinogenic LAB against beer-spoilage LAB and development of bacteriocin resistant mutants 168

III.4.2. Identification of Enterococcus faecium L50 bacteriocins with antimicrobial activity against beer-spoilage LAB 170

III.4.3. Safety aspects of Enterococcus faecium L50 172

III.4.4. Growth, survival and production of Enterococcus faecium L50 bacteriocins in wort (hopped and unhopped) and lager beers 172

III.4.5. Bactericidal effect of Enterococcus faecium L50 bacteriocins against beer-spoilage LAB in MRS broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers 174

III.4.6. Effect of temperature on enterocin L50 (L50A and L50B) activity during brewing process and storage	177
III.5. DISCUSSION	179
III.6. REFERENCES	186
 Capítulo IV/Chapter IV	
DESARROLLO DE CEPAS BACTERIOCINOGENICAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CON LA CAPACIDAD DE EXPRESAR Y SECRETAR HETERÓLOGAMENTE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B, LOS DOS PÉPTIDOS SIN EXTENSIÓN N-TERMINAL QUE CONSTITUYEN LA ENTEROCINA L50 DE <i>Enterococcus faecium</i> L50	
DEVELOPMENT OF BACTERIOCINOGENIC STRAINS OF <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HETEROLOGOUSLY EXPRESSING AND SECRETING ENTEROCINS L50A AND L50B, THE TWO-LEADER-LESS PEPTIDES OF ENTEROCIN L50 FROM <i>Enterococcus faecium</i> L50	
	191
IV.1. ABSTRACT	193
IV.2. INTRODUCTION	194
IV.3. MATERIALS AND METHODS	197
IV.3.1. Microorganisms, plasmids, media, and culture conditions	197
IV.3.2. DNA isolation and manipulation	198
IV.3.3. Construction of the protein expression and secretion vector pYABD01 for <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	199
IV.3.4. Cloning of enterocins L50A (entL50A) and L50B (entL50B) structural genes, separately and together, in pYABD01	200
IV.3.5. Detection and quantification of enterocins L50A and L50B heterologous production by microbiological and immunochemical assays	203
IV.3.6. Heterologous co-production of enterocins L50A and L50B by co-culture of recombinant yeasts	205
IV.3.7. Purification and mass spectrometry analysis of recombinant enterocins L50A and L50B	205
IV.3.8. Tricine-SDS-PAGE, Western blotting, and gel overlay assay	205
IV.4. RESULTS	206
IV.4.1. Construction of the <i>Saccharomyces cerevisiae</i> protein expression and secretion vector pYABD01, and cloning of entL50A and entL50B separately and together	206
IV.4.2. Heterologous expression and secretion of biologically active enterocins L50A and L50B by <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	207
IV.4.3. Purification and characterization of enterocins L50A and L50B heterologously produced by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L50A-20 (pYABD02) and <i>Sc. cerevisiae</i> L50B-4 (pYABD03), respectively	213

IV.5. DISCUSSION	216
IV.6. REFERENCES	223
Capítulo V/Chapter V	
EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y L50B) BIOLÓGICAMENTE ACTIVA POR LA LEVADURA METILOTRÓFICA <i>Pichia pastoris</i>	
<i>HETEROLOGOUS EXPRESSION AND SECRETION OF BIOLOGICALLY ACTIVE ENTEROCIN L50 (L50A AND L50B) BY THE METHYLOTROPHIC YEAST <i>Pichia pastoris</i></i>	229
V.1. ABSTRACT	231
V.2. INTRODUCTION	232
V.3. MATERIALS AND METHODS	237
V.3.1. Microorganisms, plasmids, media, and culture conditions	237
V.3.2. Basic genetic techniques and enzymes	238
V.3.3. Construction of the recombinant plasmids pBAS01, pBAS02 and pBAS03, and transformation in <i>Pichia pastoris</i> strains	239
V.3.4. Detection and quantification of enterocins L50A and L50B heterologous production by microbiological and immunochemical assays	242
V.3.5. Purification and mass spectrometry analysis of recombinant enterocins L50A and L50B	243
V.3.7. Tricine-SDS-PAGE, Western blotting, and gel overlay assay	244
V.4. RESULTS	244
V.4.1. Construction of recombinant plasmids for production of enterocins L50A and L50B, separately and together, in <i>Pichia pastoris</i>	244
V.4.2. Heterologous expression and secretion of biologically active enterocins L50A and/or L50B, separately and together, by <i>Pichia pastoris</i>	245
V.4.3. Purification and characterization of enterocins L50A and L50B heterologously produced by <i>Pichia pastoris</i> X-33A-22 (pBAS01) and <i>Pc. pastoris</i> X-33B-33 (pBAS02), respectively	250
V.5. DISCUSSION	253
V.6. REFERENCES	261

Capítulo VI/Chapter VI

DISCUSIÓN GENERAL	269
VI.1. EVALUACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN ALIMENTARIO COMO BIOCONSERVANTES DE LA CERVEZA	271
VI.1.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN ALIMENTARIO Y DE SUS BACTERIOCINAS FRENTE A BACTERIAS LÁCTICAS ALTERANTES DE LA CERVEZA	271
VI.1.2. ASPECTOS DE SEGURIDAD DE <i>Enterococcus faecium</i> L50	276
VI.1.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE <i>Enterococcus faecium</i> DE DESARROLLARSE Y PRODUCIR BACTERIOCINAS EN DIFERENTES SUSTRATOS CERVECEROS	278
VI.1.4. EVALUACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE <i>Enterococcus faecium</i> L50 EN LA VIABILIDAD DE BACTERIAS LÁCTICAS ALTERANTES DE LA CERVEZA Y DE LA TASA DE APARICIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS RESISTENTES	281
VI.1.5. ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y L50B) DE <i>Enterococcus faecium</i> L50 EN DIVERSOS SUSTRATOS CERVECEROS	283
VI.2. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B) DE <i>Enterococcus faecium</i> L50 EN LEVADURAS	285
VI.2.1. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B) EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	287
VI.2.1.1. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS pYABD01 PARA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	288
VI.2.1.2. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	289
VI.2.1.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENTEROCINAS L50A y L50B PRODUCIDAS HETERÓLOGAMENTE POR <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L50A-20 (pYABD02) y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L50B-4 (pYABD03), RESPECTIVAMENTE	293
VI.2.2. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B) EN <i>Pichia pastoris</i>	298
VI.2.2.1. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LAS ENTEROCINAS L50A Y/O L50B EN <i>Pichia pastoris</i>	299
VI.2.2.2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B PRODUCIDAS HETERÓLOGAMENTE POR <i>Pichia pastoris</i> X-33A-22 (pBAS01) Y <i>Pichia pastoris</i> X-33B-33 (pBAS02), RESPECTIVAMENTE	303
VI.2.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y <i>Pichia pastoris</i> COMO HOSPEDADORES HETERÓLOGOS PARA LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B)	306

Capítulo VII/Chapter VII

CONCLUSIONES	313
---------------------------	-----

CONCLUSIONS	315
--------------------------	-----

Capítulo VIII

BIBLIOGRAFÍA	319
---------------------------	-----

Apéndices

APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS	373
--	-----

1. ABREVIATURAS GENERALES	373
---------------------------------	-----

2. ABREVIATURAS DE UNIDADES	377
-----------------------------------	-----

3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS	377
--	-----

4. ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS	378
--------------------------------------	-----

5. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS	378
---	-----

APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO	379
--	-----

APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS	379
---	-----

APÉNDICE 4. GLOSARIO	380
-----------------------------------	-----

APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS	385
--	-----

APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS	387
---	-----

RESUMEN/ *ABSTRACT*

Enterococcus faecium L50 una bacteria láctica bacteriocinogénica aislada de un embutido crudo curado español elaborado artesanalmente, produce tres bacteriocinas (cuatro péptidos) de pequeño tamaño molecular y termoestables que se sintetizan ribosomalmente sin modificaciones postraduccionales (clase II): (i) enterocina P (EntP), una bacteriocina del tipo pediocina (subclase IIa) que se sintetiza con una extensión N-terminal del tipo péptido señal; (ii) enterocina L50 (EntL50), una bacteriocina constituida por dos péptidos que se sintetizan sin extensión N-terminal cuya actividad antimicrobiana total depende de la actividad de la enterocina L50A (EntL50A) y la enterocina L50B (EntL50B), que contienen 44 y 43 aminoácidos, respectivamente, y cuya secuencia presenta una gran homología (72% de identidad), por lo que EntL50 (EntL50A y EntL50B) puede clasificarse en las subclases IIb y IIc y (iii) enterocina Q (EntQ), una bacteriocina que se sintetiza sin extensión N-terminal (subclase IIc). La producción de estas bacteriocinas por *E. faecium* L50 está influida por la temperatura de incubación, así pues, EntL50 (EntL50A y EntL50B) se produce en el rango de temperaturas de 16–42°C, aunque su producción es insignificante cuando la temperatura es superior a 37°C, mientras que EntP y EntQ se sintetizan a temperaturas comprendidas entre 16 y 47°C. Los determinantes genéticos que codifican la producción de, e inmunidad a, EntL50 (EntL50A y EntL50B), EntQ y EntP se localizan en el plásmido pCIZ1 (aprox., 50 kb), en el plásmido pCIZ2 (aprox., 7,4 kb) y en pCIZ1 y el cromosoma de *E. faecium* L50, respectivamente. La producción de estas bacteriocinas confiere a *E. faecium* L50 un amplio espectro de acción antimicrobiano frente a: (i) bacterias patógenas productoras de toxiinfecciones alimentarias, como *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Listeria monocytogenes*, (ii) bacterias patógenas de hombres y animales, como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* y *Streptococcus pneumoniae* y (iii) bacterias lácticas alterantes de los alimentos, como *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Pediococcus* spp. En este trabajo se describe la actividad antimicrobiana comparada de seis bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario, entre las que se incluyen *E. faecium* L50 (productora de EntL50 [EntL50A y EntL50B], EntP y EntQ), *E. faecium* T136 (productora de las enterocinas A y B), *E. faecium* P13 (productora de EntP), *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* (productora de nisina A), *Pediococcus acidilactici* 347 (productora de pediocina PA-1) y *Lactobacillus sakei* 148 (productora de lactocina S), frente a 34 bacterias lácticas alterantes de la cerveza, así como la evaluación de la aplicación potencial de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 como bioconservantes de la cerveza en diversas etapas de su proceso de elaboración para inhibir el desarrollo de las bacterias lácticas alterantes de este producto. Asimismo, se ha investigado la viabilidad del desarrollo mediante ingeniería genética de cepas bacteriocinogénicas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* que expresen y secreten EntL50 (EntL50A y/o EntL50B) biológicamente activa.

En primer lugar (Capítulo III), *E. faecium* L50 ejerció una amplia y potente actividad antimicrobiana frente a diversas cepas de las especies de bacterias lácticas alterantes de la cerveza más relevantes (*i.e.*, *Lactobacillus brevis* y *Pediococcus damnosus*), que fue debida principalmente a la producción de EntL50 (EntL50A y EntL50B). Además, EntL50A y EntL50B sintetizadas *in vitro* mostraron actividad antimicrobiana independiente, siendo significativamente mayor la actividad

antimicrobiana de EntL50A; asimismo, la utilización combinada de ambos péptidos permitió detectar un efecto sinérgico en su actividad antimicrobiana. Conviene destacar que *E. faecium* L50 puede considerarse como una cepa no virulenta ya que los únicos genes que codifican factores potenciales de virulencia que se detectaron fueron *efaA_{fm}* (adhesina de la pared celular) y *ccf* (feromona sexual) y esta cepa fue susceptible a los antibióticos de mayor relevancia clínica, tales como ampicilina, penicilina, vancomicina y gentamicina. Por otra parte, *E. faecium* L50 sobrevivió, pero no se desarrolló ni mostró actividad antimicrobiana en mosto de cerveza (con y sin lúpulo), cerveza (1–5% de etanol, vol/vol) y “cerveza” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol). Sin embargo, cuando el mosto sin lúpulo se suplementó con un 50% (vol/vol) de caldo MRS, *E. faecium* L50 se desarrolló y mostró una actividad antimicrobiana similar a la obtenida en caldo MRS. Además, las enterocinas producidas por esta cepa ejercieron un efecto bactericida dependiente de la dosis y el sustrato (reducción de cinco ciclos logarítmicos) frente a *Lb. brevis* y *P. damnosus* desarrollados en caldo MRS, mosto de cerveza (con y sin lúpulo), cerveza (1–5% de etanol, vol/vol) y “cerveza” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol) a 32°C, no detectándose la aparición y el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes incluso transcurridos 6–15 días de incubación de los cultivos. Asimismo, las enterocinas de *E. faecium* L50 en mosto y cerveza (5% de etanol, vol/vol) resistieron los tratamientos térmicos llevados a cabo generalmente en la industria cervecera para la maceración (tratamientos térmicos sucesivos a 45, 62, 72 y 78°C durante 30 min, en mosto sin lúpulo), ebullición (tratamiento térmico a 100°C durante 90 min, en mosto con lúpulo), fermentación (tratamiento térmico a 15°C durante 6–10 días, en mosto con lúpulo) y pasteurización (tratamientos térmicos a 65 y 75°C durante 40 y 10 min, respectivamente, en cerveza [5% de etanol, vol/vol]). Además, estas enterocinas retuvieron gran parte de su actividad antimicrobiana en cerveza (5% de etanol, vol/vol) después de su almacenamiento prolongado a 8 y 25°C. Considerados globalmente, estos resultados revelaron la eficacia de las bacteriocinas de *E. faecium* L50, principalmente EntL50 (EntL50A y EntL50B), como bioconservantes de la cerveza en diversas etapas de su proceso de elaboración con el objeto de controlar su alteración por el desarrollo de bacterias lácticas.

Posteriormente (Capítulo IV), se construyó un vector de expresión y secreción de proteínas para *Sc. cerevisiae*, pYABD01, mediante la clonación de la región génica que codifica el péptido señal de la feromona factor α 1 (*MF α 1_s*) de esta levadura, que incluye el sitio de unión de la enzima Kex2 necesario para el procesamiento de la proteína fusionada, en el vector de expresión de proteínas para *Sc. cerevisiae* pYES2. Los genes estructurales de EntL50A (*entL50A*) y EntL50B (*entL50B*) se clonaron, independiente y conjuntamente (*entL50AB*), en pYABD01, bajo el control del promotor inducible por galactosa P_{GAL1}, y se obtuvieron los plásmidos pYABD02 (*entL50A*), pYABD03 (*entL50B*) y pYABD04 (*entL50AB*). Estos plásmidos recombinantes se transformaron en *Sc. cerevisiae* INVSc1 y se obtuvieron las cepas *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) y *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04). El empleo de ensayos microbiológicos y anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada anti-LR1-KLH (frente a EntL50A) y anti-LR2-KLH (frente a EntL50B) en un ensayo inmunoenzimático indirecto no competitivo (ELISA-NCI), permitió la detección y cuantificación de la producción de estos péptidos en los sobrenadantes libres de

células de los cultivos de estas levaduras recombinantes desarrollados en medios mínimo y complejo (SCGR e YPGR, respectivamente), aunque no se detectó actividad antimicrobiana en los correspondientes medios sólidos. La máxima actividad antimicrobiana se detectó en los sobrenadantes concentrados de las cepas *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (255 UB/mg masa celular seca [mgMCS]) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (165 UB/mgMCS) desarrolladas en SCGR. Asimismo, *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) secretaron eficientemente EntL50A (8,4 y 5,2 ng/mgMCS en SCGR e YPGR, respectivamente) y EntL50B (24,0 y 19,1 ng/mgMCS en SCGR e YPGR, respectivamente) biológicamente activos. Conviene destacar que, en el medio óptimo SCGR, *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) secretó una cantidad de EntL50A biológicamente activo (10,4 ng/mgMCS) mayor que *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02); sin embargo, *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) no produjo EntL50B. Por otra parte, los péptidos recombinantes EntL50A y EntL50B se purificaron de los sobrenadantes de los cultivos de *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, desarrollados en SCGR. Los análisis mediante espectrometría de masas de los péptidos recombinantes purificados mostraron que EntL50A se asocia probablemente a un compuesto desconocido producido por la levadura y que EntL50B es procesado correctamente por la enzima Kex2. Asimismo, los análisis en geles de Tricina-SDS-poliacrilamida de los péptidos recombinantes EntL50A y EntL50B revelaron una banda proteica con el tamaño molecular esperado y agregados proteicos que se detectaron específicamente mediante *Western blotting* y que mostraron actividad biológica mediante un *Overlay assay*. Considerados globalmente, estos resultados demostraron la eficacia del vector recombinante pYABD01 para permitir el transporte y la secreción de EntL50A y EntL50B biológicamente activos por *Sc. cerevisiae* dirigidos por MF α 1_s a través del sistema Sec.

Finalmente (Capítulo V), se evaluó la expresión y secreción de EntL50A y EntL50B biológicamente activos, independiente y conjuntamente, por la levadura metilotrófica *Pc. pastoris*. Los genes estructurales *entL50A* y *entL50B*, fusionados a MF α 1_s, se clonaron, independiente y conjuntamente (*entL50AB*), en el vector de expresión y secreción de proteínas pPICZ α A, bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa inducible por metanol (P_{AOX1}), y se obtuvieron los plásmidos pBAS01 (*entL50A*), pBAS02 (*entL50B*) y pBAS03 (*entL50AB*). Estos plásmidos recombinantes se integraron en el genoma de *Pc. pastoris* X-33 y se obtuvieron las cepas *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) y *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03). La producción de EntL50A y/o EntL50B por las levaduras recombinantes, desarrolladas en los medios complejo y mínimo tamponados con metanol (BMMY y BMM, respectivamente), se evaluó y cuantificó mediante el empleo de métodos microbiológicos y los anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada anti-LR1-KLH y anti-LR2-KLH en un ELISA-NCI. Estas levaduras recombinantes ejercieron actividad antimicrobiana en medio sólido y líquido, obteniéndose el valor máximo en los sobrenadantes de los cultivos de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (310 UB/mgMCS) desarrollados en BMM, seguido por los de *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (95 UB/mgMCS) desarrollados en BMMY y *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (65 UB/mgMCS) desarrollados en BMM. Asimismo, en ambos medios se secretaron eficientemente EntL50A y/o EntL50B

biológicamente activos, obteniéndose la máxima producción en los cultivos de *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (1.240 ng de EntL50B/mgMCS) desarrollados en BMMY, seguida por los de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (228,5 ng de EntL50A/mgMCS) desarrollados en BMM y *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (39,3 ng de EntL50B/mgMCS y 32,8 ng de EntL50A/mgMCS) desarrollados en BMM. Por otra parte, los péptidos recombinantes EntL50A y EntL50B se purificaron de los sobrenadantes de los cultivos de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectivamente, desarrollados en BMMY. Los análisis mediante espectrometría de masas de los péptidos recombinantes purificados mostraron que la mayor parte de EntL50A se asocia probablemente a un compuesto desconocido producido por la levadura y que EntL50B es procesado correctamente por la enzima Kex2. Por último, los análisis en geles de Tricina-SDS-poliacrilamida y *Western blotting* de los péptidos recombinantes EntL50A y EntL50B revelaron una banda proteica con el tamaño molecular esperado y su tendencia a la formación de agregados; además, mediante un *Overlay assay* se demostró la actividad biológica de ambos péptidos procesados y secretados eficientemente por *Pc. pastoris* dirigidos por MF α 1_s a través del sistema Sec.

Enterococcus faecium L50, a bacteriocinogenic lactic acid bacteria (LAB) isolated from an artisanal Spanish dry-fermented sausage, produces three ribosomally synthesized, nonmodified, small, heat-stable class II bacteriocins (four peptides): (i) enterocin P (EntP) is a pediocin-like bacteriocin (subclass IIa) synthesized with a Sec-dependent N-terminal extension (signal peptide); (ii) enterocin L50 (EntL50) is a two-leader-less peptide bacteriocin whose full antimicrobial activity requires the activity of enterocin L50A (EntL50A) and enterocin L50B (EntL50B), consisting of 44 and 43 amino acids, respectively, and sharing 72% sequence identity, and thus EntL50 may be categorized either in subclass IIb or IIc; and (iii) enterocin Q (EntQ) is a subclass IIc leader-less bacteriocin. Interestingly, multiple bacteriocin production by *E. faecium* L50 is a temperature-regulated process: EntL50 (EntL50A and EntL50B) is produced at 16–42°C but production is negligible when the growth temperature is above 37°C, whereas EntP and EntQ are synthesized at temperatures ranging from 16 to 47°C. The genetic determinants required for the production of, and immunity against, EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntQ and EntP are located on the 50-kb-plasmid pCIZ1, the 7.4-kb-plasmid pCIZ2, and pCIZ1 and the chromosome from *E. faecium* L50, respectively. This multiple bacteriocin production confers to *E. faecium* L50 a broad antimicrobial spectrum against: (i) food-borne pathogenic bacteria, such as *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*; (ii) human and animal clinical pathogens, such as *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* and *Streptococcus pneumoniae*; and (iii) food-spoilage LAB, such as *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. and *Pediococcus* spp. The present work describes the comparative antimicrobial spectrum of six bacteriocinogenic LAB of food origin, including *E. faecium* L50 (EntL50 [EntL50A and EntL50B], EntP and EntQ producer), *E. faecium* T136 (enterocins A and B producer), *E. faecium* P13 (EntP producer), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (nisin A producer), *Pediococcus acidilactici* 347 (pediocin PA-1 producer), and *Lactobacillus sakei* 148 (lactocin S producer), against 34 representative beer-spoilage LAB, as well as the potential application of bacteriocins from *E. faecium* L50 as beer-biopreservatives at various stages of the brewing process to inhibit the growth of beer-spoilage LAB. Likewise, the feasibility of developing genetically engineered bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* heterologously expressing and secreting the broad spectrum two-peptide bacteriocin EntL50 (EntL50A and/or EntL50B) has been investigated.

First (Chapter III), *E. faecium* L50 displayed a broad antimicrobial spectrum against the most relevant beer-spoilage LAB (*i.e.*, *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus damnosus*), which is mainly due to the production of EntL50 (EntL50A and EntL50B). Moreover, bacteriocin assays using *in vitro* synthesized EntL50 (EntL50A and EntL50B) showed that both individual peptides possess antimicrobial activity on their own, being EntL50A the most active, but when the two peptides were combined a synergistic effect was observed. It is noteworthy that *E. faecium* L50 may be considered as an avirulent strain since the only virulence genes detected were *efaA_{fm}* (cell wall adhesin) and *ccf* (sex pheromone), and this strain was susceptible to most clinically relevant antibiotics, such as ampicillin, penicillin, vancomycin and gentamycin. On the other hand, *E. faecium* L50 survived but did not grow nor showed antimicrobial activity in hopped and unhopped wort, and alcoholic (1 and 5% ethanol,

vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) commercial lager beers. However, when unhopped wort was supplemented with 50% (vol/vol) MRS broth, *E. faecium* L50 grew and produced antimicrobial activity similarly as in MRS broth. Furthermore, the enterocins produced by this strain were bactericidal (5 log decrease) against *Lb. brevis* and *P. damnosus* in a dose- and substrate-dependent manner when challenged in MRS broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers at 32°C, and no bacterial resistances were detected even after incubation for 6–15 days. In addition, the enterocins in wort and lager beer (5% ethanol, vol/vol) withstood the heat treatments commonly employed in the brewing industry for mashing (consecutive heating at 45, 62, 72 and 78°C for 30 min, in unhopped wort), boiling (100°C for 90 min, in hopped wort), fermentation (15°C for 6–10 days, in hopped wort), and pasteurization (65°C for 40 min and 75°C for 10 min, in lager beer), and retained most of their antimicrobial activity in lager beer (5% ethanol, vol/vol) after long-term storage at 8 and 25°C. Taken together, these results showed the suitability of bacteriocins from *E. faecium* L50, mainly EntL50A (EntL50A and EntL50B), as beer-biopreservatives at various stages of the brewing process to control beer-spoilage by LAB.

Second (Chapter IV), a protein expression and secretion vector for *Sc. cerevisiae*, pYABD01, was constructed by cloning the yeast gene region encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal (*MF α 1_s*), including the Kex2 enzyme signal cleavage site required for processing of the fusion protein, into the *Sc. cerevisiae* nonfusion protein expression vector pYES2. The structural genes of EntL50A (*entL50A*) and EntL50B (*entL50B*) were cloned, separately and together (*entL50AB*), in pYABD01 under control of the galactose-inducible promoter P_{GAL1} to generate the plasmids pYABD02 (*entL50A*), pYABD03 (*entL50B*) and pYABD04 (*entL50AB*). These recombinant plasmids were further transformed into *Sc. cerevisiae* INVSc1 resulting in the strains *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) and *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04). By using antimicrobial assays and specific anti-LR1-KLH (for EntL50A) and anti-LR2-KLH (for EntL50B) antibodies in a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA), bacteriocin production by recombinant yeasts was detected and quantified in cell-free culture supernatants from cultures grown both in minimal and complex media (SCGR and YPGR, respectively), but no in the corresponding solid media. The maximum antimicrobial activity was found in concentrated supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (255 BU/mg cell dry weight [mgCDW]) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (165 BU/mgCDW) grown in SCGR. Likewise, *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) secreted efficiently biologically active EntL50A (8.4 and 5.2 ng/mgCDW in SCGR and YPGR, respectively) and EntL50B (24.0 and 19.1 ng/mgCDW in SCGR and YPGR, respectively). Strikingly, in the optimal medium SCGR, *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) secreted a higher amount of biologically active EntL50A (10.4 ng/mgCDW) than *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), but EntL50B was not produced. On the other hand, recombinant EntL50A and EntL50B were purified from supernatants of *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, grown in SCGR, and the mass spectrometry analyses of purified recombinant peptides showed that EntL50A is probably associated to an hitherto unknown yeast

compound, and that EntL50B is correctly processed by the Kex2 enzyme. In addition, Tricine-SDS-PAGE analyses of recombinant EntL50A and EntL50B revealed one major band with the expected size and bacteriocin aggregates, that were specifically detected by Western blotting, and further shown to be biologically active by an overlay assay. Taken together, these results demonstrated the suitability of the generated *MFα1_s*-containing recombinant vector pYABD01 to direct efficiently processing and secretion of biologically active EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* through the yeast Sec system.

Finally (Chapter V), the expression and secretion of biologically active EntL50A and EntL50B, separately and together, by the methylotrophic yeast *Pc. pastoris* was evaluated. The structural genes *entL50A* and *entL50B*, fused to *MFα1_s*, were cloned, separately and together (*entL50AB*), into the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZαA, under control of the methanol-inducible alcohol oxidase promoter (P_{AOX1}), generating the plasmids pBAS01 (*entL50A*), pBAS02 (*entL50B*) and pBAS03 (*entL50AB*). These recombinant plasmids were further integrated into the genome of *Pc. pastoris* X-33 resulting in the strains *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03). EntL50A and/or EntL50B production by recombinant yeasts, grown both in buffered methanol-complex and minimal media (BMMY and BMM, respectively), was evaluated and quantified by using microbiological methods and specific anti-LR1-KLH and anti-LR2-KLH antibodies in an NCI-ELISA. The recombinant yeasts displayed antimicrobial activity both in solid and liquid media, and the maximum antimicrobial activity was found in culture supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (310 BU/mgCDW) grown in BMM, followed by *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (95 BU/mgCDW) grown in BMMY, and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (65 BU/mgCDW) grown in BMM. Likewise, biologically active recombinant EntL50A and/or EntL50B were efficiently secreted both in media being the maximum production achieved by cultures of *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (1,240 ng of EntL50B/mgCDW) grown in BMMY, followed by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (228.5 ng of EntL50A/mgCDW) grown in BMM, and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (39.3 ng of EntL50B/mgCDW and 32.8 ng of EntL50A/mgCDW) grown in BMM. On the other hand, recombinant EntL50A and EntL50B were purified from supernatants of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively, grown in BMMY, and the mass spectrometry analyses of purified recombinant peptides showed that most EntL50A is probably associated to an hitherto unknown yeast compound, and that EntL50B is correctly processed by the Kex2 enzyme. Finally, Tricine-SDS-PAGE and Western blotting analyses of recombinant EntL50A and EntL50B revealed one major band with the expected size and their tendency to aggregate, and an overlay assay demonstrated the biological activity of both bacteriocin peptides processed and secreted by *Pc. pastoris* directed by *MFα1_s* through the yeast Sec system.

CAPÍTULO I/ CHAPTER I

Exposición general del problema a investigar: objetivos

General Account of the Research Subject: Objectives

El Real Decreto 53/1995 de 20 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y la malta líquida (BOE nº 34 de 9 de febrero de 1995), define a la cerveza como la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada (*Saccharomyces* spp.), de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcar por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción.

La cerveza es una bebida con una alta estabilidad microbiológica y, en principio, no constituye un medio adecuado para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. En este contexto, su bajo potencial de óxido-reducción, junto con otros factores intrínsecos de estrés microbiano como su bajo pH (3,8–4,7), presencia de isohumulonas del lúpulo (17–55 mg de iso- α -ácidos/l), la concentración de etanol (1–10%, vol/vol), dióxido de carbono (aprox., 0,5%, m/vol), ácidos orgánicos, acetaldehído y otros metabolitos antimicrobianos y su relativamente bajo contenido en nutrientes, principalmente hidratos de carbono y aminoácidos, impiden, en principio, el crecimiento de los microorganismos patógenos y de la mayoría de los microorganismos alterantes. Además, la industria cervecera utiliza factores extrínsecos que limitan el crecimiento microbiano, entre los que se incluyen la ebullición del mosto, la refrigeración, la filtración, la pasteurización, el envasado aséptico, el mantenimiento de unas correctas prácticas de higiene y asepsia y la utilización de conservantes químicos como, por ejemplo, el ácido benzoico y sus sales (benzoatos) y el dióxido de azufre y sus sales (sulfitos). No obstante, a pesar de estos factores de estrés microbiano, tanto durante la elaboración de la cerveza como en el producto final pueden producirse problemas microbiológicos relacionados con la aparición de alteraciones visibles (filamentosis, turbidez, sedimentación y decoloración), exceso de acidez y gas y desarrollo de aromas anómalos (diacetilo, ácidos láctico y acético, 2,3-butanodiol, dihidroxiacetona y compuestos fenólicos) originados por el desarrollo y la actividad metabólica de microorganismos ajenos a los que participan en la fermentación, entre los que se incluyen levaduras y diversas bacterias Gram-positivas (bacterias lácticas) y Gram-negativas (bacterias acéticas y enterobacterias). A este respecto, la alteración debida al desarrollo de bacterias lácticas, principalmente de las especies *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* y *Pediococcus damnosus*, representa en la actualidad un grave problema para la moderna industria cervecera, tanto por sus importantes repercusiones económicas, que pueden ser suficientemente graves como para amenazar la continuidad de las compañías cerveceras, especialmente de las más pequeñas, como por el detrimento que provoca en la calidad higiénico-sanitaria del producto final. Actualmente se conoce que el inóculo de levadura utilizado durante la elaboración de la cerveza para la fermentación del mosto (cultivo iniciador) constituye el principal reservorio de bacterias lácticas contaminantes. De forma general, la problemática de estos microorganismos alterantes en la industria cervecera se debe, principalmente, a: (i) su capacidad para desarrollarse durante la fermentación y maduración, así como, en el caso de pediococos, en la cerveza elaborada, (ii) la gravedad de las alteraciones que producen, entre las que destaca la “enfermedad sarcina”, causada por *Pediococcus* spp., caracterizada por un exceso de acidez, turbidez sedosa, sedimento granular, filamentosis y aparición de sabores y aromas anómalos debido a la producción de 2,3-butanodiol y diacetilo, (iii) su capacidad para colonizar los equipos de producción y (iv) la

dificultad de su erradicación del inóculo de levadura empleado, así como del ambiente de la planta, debido a su elevada resistencia a los productos de limpieza y desinfección. Por otra parte, aunque la utilización de dióxido de azufre y sulfitos como conservantes químicos y antioxidantes está muy generalizada en la industria cervecera, se tiene constancia desde hace tiempo de que su presencia en la cerveza puede originar en algunos consumidores reacciones adversas como choque anafiláctico, reacciones asmáticas, urticaria, náuseas, dolores abdominales y diarrea. Por todo ello, resulta de gran interés la investigación de nuevas metodologías que permitan minimizar el riesgo de alteración microbiana de la cerveza y, a su vez, evitar el empleo de dióxido de azufre y sulfitos o reducir las dosis a las que se utilizan habitualmente en la industria cervecera. En este contexto, dado que la seguridad e inocuidad de las bacterias lácticas asociadas a los alimentos se ha aceptado durante mucho tiempo (microorganismos GRAS, del inglés *Generally Recognized as Safe*, y su equivalente europeo QPS, del inglés *Qualified Presumption of Safety*), se ha sugerido su empleo y/o el de sus metabolitos como bioconservantes para que, formando parte de un sistema de “barreras” u “obstáculos”, permitan garantizar la seguridad y calidad higiénica de los alimentos que se consumen. De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas (péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal) son las más interesantes tecnológicamente, debido a su termoestabilidad, su actividad a pH ácido y neutro, su inactivación por la acción de enzimas proteolíticas de origen gástrico y/o pancreático, etc., como bioconservantes alimentarios para inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos. A este respecto, y de forma general, existen tres estrategias para la aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica bacteriocinogénica, para que ésta produzca la bacteriocina *in situ* (cultivo protector y/o cultivo iniciador); (ii) adición como ingrediente alimentario de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica y (iii) adición como aditivo alimentario de la bacteriocina purificada o parcialmente purificada. Los estudios realizados sobre la posible utilidad de las bacterias lácticas y sus bacteriocinas como bioconservantes de la cerveza son muy escasos y se han basado principalmente en el empleo de nisina A (NisA), producida por diversas cepas de *Lactococcus lactis*, que, hasta la fecha, es la única bacteriocina autorizada internacionalmente como aditivo antimicrobiano en determinados tipos de productos. En este contexto, en la Unión Europea está permitida la utilización de NisA como conservante (E-234) en determinados tipos de quesos, productos lácteos y postres. Asimismo, en Australia y Nueva Zelanda también está permitida su adición como conservante de la cerveza.

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo de investigación tiene por objeto el desarrollo y la evaluación de un método de bioconservación de la cerveza basado en la utilización de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de origen alimentario como un componente más de un sistema de protección de la calidad en el que se incluyen además diversas “barreras” u “obstáculos” al desarrollo de las bacterias lácticas alterantes de este producto. A este respecto, se dispone de una colección de bacterias lácticas bacteriocinogénicas aisladas previamente de diversos orígenes (productos cárnicos, leche, productos lácteos, pescados, mariscos, productos de la pesca y animales de caza menor), entre las que destacan por su actividad antimicrobiana las cepas de origen cárnico *Lc. lactis* subesp. *lactis* BB24 (productora de NisA), *Pediococcus acidilactici* 347 (productora de pediocina

PA-1), *Enterococcus faecium* L50 (productora de enterocina L50 [L50A y L50B], enterocina P [EntP] y enterocina Q), *E. faecium* P13 (productora de EntP), *E. faecium* T136 (productora de enterocinas A y B) y *Lactobacillus sakei* 148 (productora de lactocina S). En este contexto, se estableció como hipótesis de partida que la utilización de: (i) estas bacteriocinas y/o sus mezclas, parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad, (ii) los medios fermentados por estas bacterias lácticas bacteriocinogénicas o por cepas recombinantes bacteriocinogénicas de *Saccharomyces cerevisiae* y/o (iii) estas levaduras con la capacidad de producir bacteriocinas biológicamente activas en la cerveza, contribuiría a impedir la alteración microbiana de este producto por el desarrollo de bacterias lácticas y, probablemente, evitar el empleo de dióxido de azufre y sulfitos o reducir las dosis a las que se utilizan habitualmente en la industria cervecera. Conviene destacar que la estrategia de bioconservación de la cerveza propuesta en este trabajo no sólo contribuiría a garantizar su calidad higiénico-sanitaria, sino que también satisfaría las demandas de los consumidores que, cada vez más, requieren alimentos más estables y seguros pero, a su vez, más naturales, menos procesados y con menos aditivos químicos. A este respecto, los objetivos generales de este trabajo de investigación son la evaluación de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario citadas anteriormente como bioconservantes de la cerveza, así como la expresión y secreción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) en *Sc. cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Para lograr estos objetivos resulta necesario proceder al desarrollo y consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario y sus bacteriocinas frente a bacterias lácticas alterantes de la cerveza.
2. Identificación de la(s) bacteriocina(s) de la bacteria láctica seleccionada responsable(s) de su actividad antimicrobiana.
3. Evaluación de los aspectos higiénico-sanitarios y de seguridad de la bacteria láctica seleccionada.
4. Evaluación de la capacidad de la bacteria láctica seleccionada de desarrollarse y producir bacteriocina(s) biológicamente activa(s) en mosto de cerveza (con y sin lúpulo), cervezas con diferente graduación alcohólica (1–5% de etanol, vol/vol) y “cerveza” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol).
5. Determinación del efecto de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) en la viabilidad de las principales bacterias lácticas alterantes de la cerveza (*Lb. brevis*, *Lb. lindneri* y *P. damnosus*) y evaluación de la tasa de aparición de poblaciones bacterianas resistentes en medios de cultivo, mosto de cerveza (con y sin lúpulo), cervezas con diferente graduación alcohólica (1–5% de etanol, vol/vol) y “cerveza” sin alcohol (0 de etanol, vol/vol).
6. Evaluación de la estabilidad, en mosto cervecero y cerveza (5% de etanol, vol/vol), de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) frente a los tratamientos térmicos llevados a cabo durante el proceso de elaboración de la cerveza y durante su almacenamiento a refrigeración (8°C) y temperatura ambiente (25°C).
7. Caracterización molecular del mecanismo implicado en la secreción e inmunidad de la(s) bacteriocina(s) de la bacteria láctica seleccionada.

I. Exposición general del problema a investigar: objetivos

8. Diseño, construcción y análisis funcional de un vector de expresión y secreción de proteínas para *Sc. cerevisiae*.
9. Clonación, expresión y secreción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) en *Sc. cerevisiae*.
10. Detección y cuantificación biológica e inmunoquímica de la producción de la(s) bacteriocina(s) por las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae*.
11. Purificación a homogeneidad de la(s) bacteriocina(s) producida(s) heterológamente, determinación de su masa molecular y análisis electroforético.
12. Clonación, expresión y secreción heteróloga de la(s) bacteriocina(s) seleccionada(s) en *Pc. pastoris*.
13. Detección y cuantificación biológica e inmunoquímica de la producción de la(s) bacteriocina(s) por las cepas recombinantes de *Pc. pastoris*.
14. Purificación a homogeneidad de la(s) bacteriocina(s) producida(s) heterológamente, determinación de su masa molecular y análisis electroforético.

The Royal Decree 53/1995 of 20 January, that approves the Technical-Sanitary Regulation for the production, circulation and trade of beer and liquid malt (BOE no. 34 of 9 February 1995), defines beer as the beverage made through the alcoholic fermentation of a malted barley wort, either alone or in combination with other amilaceous compounds susceptible to enzymatic digestion yielding sugar, by selected yeasts (*Saccharomyces* spp.), in which hop and/or hop extracts are added and that is further subjected to a boiling process.

Beer is a highly microbiologically-stable beverage, since it constitutes an unfavourable medium for the growth of most microorganisms. In principle, the low oxidation/reduction potential of beer, together with other intrinsic factors of microbial stress, such as the low pH (3.8–4.7), the presence of hop bitter compounds (*ca.*, 17–55 ppm of iso- α -acids), the concentration of ethanol (1–10%, vol/vol), carbon dioxide (*ca.*, 0.5%, wt/vol), organic acids, acetaldehyde and other antimicrobial metabolites, and the presence of extremely low amounts of nutritive substances such as carbohydrates and aminoacids, impede the growth of food-borne pathogens and most spoilage causing microorganisms. Moreover, the brewing industry uses extrinsic factors to prevent microbial growth, including wort boiling, refrigeration, filtration, pasteurization, aseptic packaging, compliance of good hygienic practices, and the use of chemical preservatives such as benzoic acid and its salts (benzoates) and sulphur dioxide and its salts (sulphites). However, in spite of these factors of microbial stress, a number of microbiological alterations may arise during the brewing process and in the final product, including visible beer-spoilage (haze, turbidity, granular sediments and discoloration), excess of acidity and gas, and generation of off-odours such as those conferred by diacetyl, acetic and lactic acids, 2,3 butanediol and fenolic compounds, due to the growth and metabolic activity of microorganisms distinct to those taking part into the fermentation process, including yeasts and several Gram-positive (lactic acid bacteria [LAB]) and Gram-negative bacteria (acetic acid bacteria and enterobacteria). In this respect, the beer-spoilage owing to the growth of LAB, mainly within the species *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* and *Pediococcus damnosus*, is considered at present as a very important problem for the modern brewing industry, due to their associated millionaire economic losses, that may even wreck some industries, mainly the smallest ones, as well as negatively affect the hygienic and sanitary quality of the final products. Nowadays, it is widely known that the pitching yeasts used during the brewing process as starter culture for wort fermentation constitutes the main source of beer-spoilage LAB. In general terms, the concerns about these spoilage microorganisms in the brewing industry are mainly due to: (i) their ability to grow during the fermentation and lagering, as well as, in the case of *Pediococcus* spp., in beer; (ii) the seriousness of the caused spoilage, emphasizing the “sarcina-sickness” caused by *Pediococcus* spp., characterized by an excess of acidity, turbidity, granular sediments, haze and off-odours due to the production of diacetyl and 2,3 butanediol; (iii) their capacity to colonize the brewhouse equipment, and (iv) the difficulties encountered in their elimination from the pitching yeast and the brewhouse environment because of their great resistance to the cleaning and disinfecting products. On the other hand, although sulphur dioxide and sulphites are generally used as chemical preservatives and antioxidants in the brewing industry, in particular, and the food industry, in general, it is widely known for many years that these compounds may cause in some consumers side

effects such as anafilactic *shock*, asthmatic reactions, hives, sick, abdominal pain, and diarrhoea. Thus, the investigation and development of new methodologies that allow to minimize the risk of beer-spoilage microbial and, at the same time, to avoid the use of sulphur dioxide and sulphites or to reduce the doses usually added in the brewing industry constitutes a very interesting research area. In this context, considering that the safety and wholesomeness of LAB of food origin has been accepted for many decades (Generally Recognized As Safe microorganisms, GRAS status, or its European synonymus concept of “Qualified Presumption of Safety”, QPS), the use of these microorganisms and/or their metabolites as biopreservatives, as a part of a hurdle preservation technology, has been proposed to warrant the safety and hygienic quality of foods. From all over the antimicrobial compounds produced by LAB, bacteriocins (ribosomally synthesized antimicrobial peptides) are considered as the most technologically interesting as food biopreservatives to inhibit the growth of spoilage and food-borne pathogenic microorganisms because of a number of common characteristics such as their heat-stability, their biological activity at acid and neutral pH values, their inactivation by gastric and pancreatic proteolytic enzymes, their lack of toxicity and their low immunogenicity. In this respect, there are three main general strategies to use bacteriocins as food biopreservatives: (i) adding a purified/semi-purified bacteriocin preparation as a food additive, (ii) incorporating a substrate previously fermented by a bacteriocin-producing strain as a food ingredient, and/or (iii) inoculating the food with a bacteriocinogenic strain with the ability to produce the bacteriocin(s) *in situ* (protective and/or starter culture). It is noteworthy that, to date, the studies evaluating the effectiveness of the use of LAB and/or their bacteriocins as beer biopreservatives are very scarce, and mostly related to nisin A (NisA), produced by several strains of *Lactococcus lactis*, which is the only bacteriocin internationally approved as antimicrobial additive in certain types of foods. In this context, in the European Union the use of NisA as preservative (E-234) is legally allowed for certain types of cheeses, dairy products and desserts. Likewise, NisA is permitted as beer preservative in Australia and New Zealand.

Considering the above mentioned information, the objective of this research work consist on the development and evaluation of a beer-biopreservative strategy based on the use of bacteriocins produced by LAB of food origin as a part of a quality protection system including other barriers to the development of beer-spoilage LAB. In this respect, a collection of bacteriocinogenic LAB has been previously isolated from several food substrates (meat products, milk, dairy products, fish, shellfish, fish products and small game animals), including the following broad antimicrobial spectrum strains of meat origin: *Lc. lactis* subsp. *lactis* BB24 (NisA producer), *Pediococcus acidilactici* 347 (pediocin PA-1 producer), *Enterococcus faecium* L50 (enterocin L50 [L50A and L50B], enterocin P [EntP] and enterocin Q producer), *E. faecium* P13 (EntP producer), *E. faecium* T136 (enterocins A and B producer) and *Lactobacillus sakei* 148 (lactocin S producer). In this context, we hypothesized that the use of: (i) these bacteriocins and/or their mixtures, semi-purified or purified to homogeneity; (ii) the media fermented by these bacteriocinogenic LAB or by recombinant bacteriocinogenic *Saccharomyces cerevisiae* strains, and/or (iii) these yeasts with the ability to produce biologically active bacteriocins in beer, would contribute to impede the microbial spoilage of this product by the development of LAB and, probably, to avoid the use of sulphur dioxide and sulphites or to reduce the doses usually added in

the brewing industry. It is noteworthy that the beer biopreservation strategy proposed in this work would contribute not only to warrant their hygienic and sanitary quality but also to satisfy the actual consumer demands for more stable and safer foods but also more natural, minimally processed and with less chemical additives. Consequently, the general objectives of this research work are the evaluation of the above mentioned bacteriocinogenic LAB of food origin as beer biopreservatives, as well as the heterologous expression and secretion of the selected bacteriocin in *Sc. cerevisiae* and *Pichia pastoris*. In order to achieve these goals, the following partial objectives will be addressed:

1. Evaluation of the antimicrobial activity of the bacteriocinogenic LAB of food origin and their bacteriocins against representative beer-spoilage LAB.
2. Identification of the bacteriocin(s) responsible for the antimicrobial activity of the selected LAB.
3. Evaluation of the hygienic and sanitary aspects and safety of the selected LAB.
4. Evaluation of the ability of the selected LAB to grow and produce biologically active bacteriocin(s) in wort (hopped and unhopped), and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0%, vol/vol) lager beers.
5. Determination of the effect of the selected bacteriocin(s) on the viability of the most relevant beer-spoilage LAB (*Lb. brevis*, *Lb. lindneri* and *P. damnosus*), and evaluation of the generation and development of bacterial resistances in growth medium, wort (hopped and unhopped), and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0%, vol/vol) lager beers.
6. Evaluation of the stability of the selected bacteriocin(s) in wort and alcoholic lager beer (5% ethanol, vol/vol) against the heat treatments commonly employed during the brewing process and long-term storage at refrigeration (8°C) and room temperature (25°C).
7. Molecular characterization of the mechanism involved in secretion and immunity of the bacteriocin produced by the selected LAB.
8. Design, construction and functional analysis of a protein expression and secretion vector for *Sc. cerevisiae*.
9. Cloning and heterologous expression and secretion of the selected bacteriocin in *Sc. cerevisiae*.
10. Biological and immunochemical detection and quantification of bacteriocin production by *Sc. cerevisiae* recombinant strains.
11. Purification to homogeneity, molecular mass determination and electrophoretic analyses of the heterologously produced bacteriocin.
12. Cloning and heterologous expression and secretion of the selected bacteriocin in *Pc. pastoris*.
13. Biological and immunochemical detection and quantification of bacteriocin production by *Pc. pastoris* recombinant strains.
14. Purification to homogeneity, molecular mass determination and electrophoretic analyses of the heterologously produced bacteriocin.

CAPÍTULO II

Introducción

II.1. LA CERVEZA

II.1.1. DEFINICIÓN, ETIMOLOGÍA E HISTORIA

El Real Decreto 53/1995 de 20 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de la cerveza y la malta líquida (BOE nº 34 de 9 de febrero de 1995), define a la cerveza como la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada (*Saccharomyces* spp.), de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcar por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción. En este Real Decreto también se definen:

1. Cervezas de cereales: bebida obtenida reemplazando una parte de la malta de cebada por malta de otros cereales. Llevará la denominación: “Cerveza de ...” seguida del cereal o cereales de procedencia en orden decreciente de su contenido en peso.
2. Cervezas extras: se consideran cervezas extras aquellas cuyo extracto seco primitivo no sea inferior al 15 por 100 en masa.
3. Cervezas especiales: se consideran cervezas especiales aquellas cuyo extracto seco primitivo no sea inferior al 13 por 100 en masa.
4. Cerveza de bajo contenido en alcohol: cervezas cuya graduación alcohólica esté comprendida entre el 1 y el 3 por 100 en volumen, incluido en dicho porcentaje la tolerancia admitida para la indicación del grado alcohólico volumétrico.
5. Cerveza sin alcohol: cervezas cuya graduación alcohólica sea menor al 1 por 100 en volumen, incluido en dicho porcentaje la tolerancia admitida para la indicación del grado alcohólico volumétrico.
6. Maltas líquidas: bebidas obtenidas del mosto de malta, con o sin lúpulo y conservadas por medios físicos. No contendrán alcohol.
7. Maltas espumosas o maltas de cereales espumosas: bebidas obtenidas por adición de anhídrido carbónico a la malta líquida.

La raíz etimológica de la palabra cerveza proviene probablemente de los términos del latín clásico “*cervisia*” o “*cerevisia*” con los que se denominaba a la cerveza. Desde Plinio, que vivió entre los años 23 y 79 d.C., los estudiosos de filología han considerado que “*cervisia*” procede de Ceres, que en la mitología latina era la diosa de la agricultura. La denominación de la cerveza en otras lenguas es “*bier*” (alemán), “*beer*” (inglés), “*biru*” (japonés), “*birra*” (italiano) y “*bière*” (francés), y todas estas palabras provienen del término en latín “*bibere*” con el que se denominaba la acción de beber (Oliver y Estrany, 2005).

Los primeros indicios escritos de la cerveza aparecen alrededor del 4.000 a.C. en tablas de arcilla encontradas en la región de Sumer (Mesopotamia) y estaban escritas en lenguaje sumerio. Estas tablas hacían mención a una bebida llamada “*sikaru*” que se obtenía por fermentación de granos, y revelan una fórmula de elaboración casera de la cerveza: se cuece el pan, se deshace en migas, se prepara la

mezcla de agua y se conseguirá una bebida que transforma a la gente en alegre, extrovertida y feliz. Existen pruebas de que los sumerios ya conocían varios tipos de cerveza, así pues, hay escritos en los que se mencionan la cerveza blanca, negra, roja, suave, dulce y una variedad denominada superior. Posteriormente, los egipcios perfeccionaron y sofisticaron las técnicas sumerias, fabricando diferentes tipos de cervezas denominadas “*zythum*”, “*karma*” y “*korma*”. Además, descubrieron la malta y añadían azafrán, miel, jengibre y comino con objeto de proporcionarle aroma y color a la cerveza. Estas cervezas presentaban una elevada estabilidad al tener un alto grado alcohólico (>12%, vol/vol), lo que permitía su venta ambulante, y que la cerveza y el pan fueran los ingredientes de mayor importancia en la dieta de los antiguos egipcios. En aquella época, la cerveza se usaba como moneda de cambio y la bebía desde el faraón hasta sus súbditos. La cervecería no floreció en Egipto hasta final del siglo octavo d.C. cuando los árabes musulmanes conquistaron la región (el Corán prohíbe la fabricación, venta y consumo de bebidas alcohólicas), no obstante, el arte de la elaboración de la cerveza se había difundido más allá de Oriente Medio. Así pues, los romanos y los griegos la consideraban una bebida de gente llana, sin embargo, los pueblos del norte de Europa celebraban con cerveza las fiestas familiares, las solemnidades religiosas y los triunfos sobre sus enemigos. También existen pruebas de que los chinos producían una clase de cerveza llamada “*kiu*” hace más de 4.000 años, la cual se fabricaba a base de cebada, trigo, espelta, mijo y arroz (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Galán *et al.*, 2004; Oliver y Estrany, 2005).

Durante la Edad Media, la actividad cervecera quedó confinada en los monasterios. Estas cervecerías monacales abastecían a la comunidad local, enriqueciendo sus fondos y prestando gran atención a la mejora de la calidad del producto final, y algunos de estos centros monásticos perduran aún en Bélgica y Holanda. En el año 736 d.C., los frailes cerveceros de la región de Baviera emplearon por primera vez lúpulo como aromatizante de la cerveza. Entre los siglos IX y XII, el lúpulo fue cultivado extensamente y utilizado para elaborar cerveza en Baviera, Eslovenia y Bohemia, y desde dichos centros se difundió gradualmente hacia el resto de Europa. Así pues, a principios del siglo XVI (1516), el duque de Baviera Guillermo IV promulgó la primera Ley de Pureza de la cerveza alemana, que prescribía el empleo exclusivo de malta de cebada, agua, lúpulo y levadura en su fabricación. No obstante, la auténtica época dorada de la cerveza comienza a finales del siglo XVIII con la incorporación de la máquina de vapor a la industria cervecera y el descubrimiento de la nueva fórmula de fermentación en frío, y culmina en el último tercio del siglo XIX con los trabajos de Louis Pasteur, en los que se demuestra que la levadura era el agente responsable de la fermentación alcohólica y que las enfermedades de la cerveza provenían del desarrollo de microorganismos. Además, ideó la pasteurización de gran utilidad para evitar las infecciones microbianas de la cerveza. En 1.883, Hansen seleccionó por primera vez cultivos puros de levaduras, lo que permite la utilización de cepas específicas con unas características determinadas para conseguir la cerveza deseada. Finalmente, la cerveza ha conseguido tener la suficiente popularidad en el mundo como para ser actualmente una de las bebidas más solicitadas. Por otra parte, las primeras noticias que se tienen sobre el consumo de cerveza en España provienen de la Edad de Bronce (1.200 a.C.), en la zona de Lérida. Su consumo continuó durante el imperio romano y visigodo y disminuyó a raíz de la conquista de España por los

musulmanes. Sin embargo, la cerveza volvió a tomar auge con el reinado de Carlos I, de origen flamenco, ya que mandó construir una fábrica de cerveza cuando se retiró al Monasterio de Yuste (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Galán *et al.*, 2004; Oliver y Estrany, 2005).

II.1.2. CONSUMO Y PRODUCCIÓN DE CERVEZA EN ESPAÑA

Según Cerveceros de España, el consumo de cerveza per cápita en España en el año 2003 alcanzó los 78 l per cápita al año, lo que supone un incremento del 6,5% con respecto al año anterior, y según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, que no tiene en cuenta el consumo realizado por los turistas, los españoles consumieron 2.355,39 millones de l de cerveza en 2003. El consumo per cápita de esta bebida, según esta fuente, fue de 57,5 l al año, lo que supone un incremento del 6,4% respecto al año anterior. A pesar de esto, España sigue siendo el décimo país en consumo de cerveza per cápita de la Unión Europea (UE), manteniéndose por debajo de la media (80 l) (Fig. 2.1). Además, la cerveza “sin alcohol” continúa aumentando su popularidad y su consumo se ha incrementado a un 8%, siendo su cuota de consumo en España la más alta de la UE (Anónimo, 2003; Estrany *et al.*, 2007).

En 2003, la producción de cerveza en España aumentó hasta los 30,7 millones de hl, debido a un aumento del consumo per cápita (6,5%) y un aumento de las exportaciones de cerveza fabricada en nuestro país (845.500 hl, 16% más que el año anterior). Así pues, España es el tercer productor de cerveza de la UE, sólo superado por Alemania y el Reino Unido, y el noveno del mundo. En 2003, se vendieron un total de 29,7 millones de hl de cerveza española (2,9 millones de hl más que en 2002) y la facturación del sector cervecero español fue de 2.400 millones de euros (Anónimo, 2003; Estrany *et al.*, 2007).

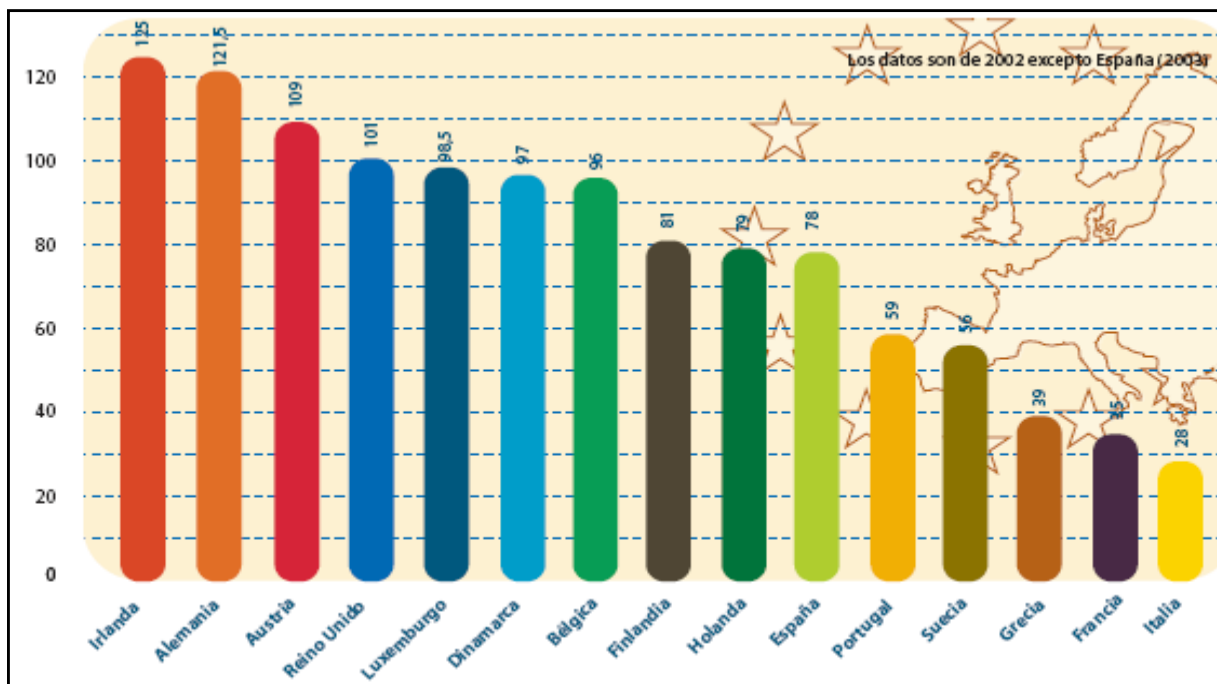


Figura 2.1. Consumo per cápita de cerveza (litros) en la UE. Fuente: Anónimo (2003).

II.1.3. MATERIAS PRIMAS Y ADITIVOS DE LA CERVEZA

II.1.3.1. CEBADA

La cebada es uno de los cereales más importantes del mundo, después del trigo, el maíz y el arroz, ya que se utiliza tanto para la alimentación humana como animal. En España, durante el año 2005, la cebada fue el cereal más cultivado y su producción fue de 4,5 millones de toneladas (Anónimo, 2006a). Todas sus especies pertenecen a la familia de las gramíneas (*Gramineae*), plantas herbáceas con flores y, concretamente, al género *Hordeum*, del que existen dos importantes especies cultivadas: (i) *Hordeum distichum*, que se emplea para la obtención de cerveza y (ii) *Hordeum hexastichum*, que se utiliza básicamente como forraje para la alimentación animal; y ambas especies pueden agruparse bajo el nombre único de *Hordeum vulgare* subesp. *vulgare* (Bamforth, 2003; Anónimo, 2006c). Las cebadas cultivadas se distinguen por el número de espiguillas que tienen las espigas (inflorescencias de la cebada). Así pues, si todas las espiguillas se presentan fértiles se originará una espiga de seis carreras (*Ho. hexastichum*), mientras que si sólo son fértiles las espiguillas centrales se originará una espiga de dos carreras (*Ho. distichum*). En la cebada de dos carreras los granos formados a ambos lados del eje de la espiga tienen el mismo tamaño, mientras que en la de seis carreras son los granos centrales los que alcanzan un tamaño mayor, encontrándose los granos laterales más delgados y deformados (Sanchís *et al.*, 2000).

Aunque en cervecería pueden emplearse diversos granos de cereal, los granos de cebada son los que presentan menos problemas técnicos durante el malteado. Así pues, el maíz no se considera adecuado debido a su alto contenido en grasas, lo que puede provocar su enranciamiento, mientras que el trigo presenta problemas de contaminación por microorganismos durante su germinación. Sin embargo, la cebada se considera un sustrato ideal debido a una serie de características, entre las que destacan: (i) su grano vestido, que protege al germen durante el malteado y los procesos de removido de la germinación; además, en la filtración del mosto, estas envolturas aligeran la capa filtrante y facilitan la separación del mosto; (ii) una gran riqueza en almidón, principal fuente de azúcares para que se produzca la fermentación, y una adecuada proporción de proteínas y sustancias nitrogenadas, responsables de suministrar aminoácidos para el crecimiento de la levadura y la formación de espuma y (iii) que, a lo largo de la historia, se ha tomado como estándar el aroma y sabor generados cuando se emplea en la fabricación de cerveza (Hough, 1990; Sanchís *et al.*, 2000).

Por otra parte, el grano de cebada empleado en la producción de cerveza debe poseer las siguientes características: (i) especialmente rico en almidón, (ii) uniforme y que germine fácilmente, para ello, se necesita que el tamaño medio de los granos sea el mismo ya que los más pequeños germinarían antes, (iii) elevado grado de viabilidad y la no existencia de una germinación previa al malteo de los granos, (iv) una dotación enzimática satisfactoria y/o (v) que produzca una cerveza homogénea y con constantes características organolépticas (Sanchís *et al.*, 2000).

Tradicionalmente en Estados Unidos se ha empleado la cebada de seis carreras para la producción de cerveza, mientras que en Europa ha sido predominante la utilización de la especie de dos carreras. Actualmente, la tendencia generalizada es el empleo de la cebada de dos carreras puesto que presenta

las ventajas de que sus granos son más uniformes en tamaño, menos ricos en proteínas y más ricos en almidón y presentan menos cascarilla. De todas formas, en algunos casos siguen utilizándose cebadas de seis carreras ya que además de presentar alguna de las características mencionadas anteriormente, poseen un contenido enzimático mayor y suplementadas con almidón procedente de otros orígenes pueden dar resultados beneficiosos (Molina, 1987; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2. ADJUNTOS

Cualquier producto distinto de la malta que se emplee en el proceso cervecero como fuente de azúcares se denomina adjunto. Estos adjuntos se añaden a la malta con tres objetivos principales: (i) abaratar los costes de producción, (ii) incrementar la estabilidad coloidal, al aportar menos compuestos nitrogenados y sustancias polifenólicas y/o (iii) producir cervezas más ligeras y menos coloreadas. La proporción de adjuntos empleada varía en cada país de acuerdo a su legislación, la disponibilidad, la presión económica y la calidad de la cerveza deseada, pero como regla general se puede considerar que varía desde un 10–30% en Europa hasta un 50–75% en ciertos países africanos y americanos. En España, según la legislación, se puede utilizar un 30% de adjuntos en la industria cervecera que se agrupan en dos clases: adjuntos sólidos y adjuntos líquidos (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003).

II.1.3.2.1. Adjuntos sólidos

Los adjuntos sólidos son materias primas sólidas, cereales malteados o no malteados diferentes de la cebada. El maíz y el arroz son los adjuntos sólidos más utilizados en la industria cervecera (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2.1.1. Maíz

El maíz (*Zea mays*) se emplea en las cervecerías en forma de sémola, copos o almidón purificado en una proporción que varía entre 10 y el 30%. Aunque su contenido de almidón es alto (aprox., 72%), los granos de maíz también contienen una fracción de lípidos relativamente alta (4–5%) asociada al germen y, por ello, es preciso eliminarlo para evitar su enranciamiento antes de emplear el maíz en cervecería. Asimismo, ya que posee una elevada temperatura de gelatinización, es esencial una precocción del grano para su solubilización (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2.1.2. Arroz

El arroz (*Oriza sativa*) puede utilizarse en forma de copos de arroz o almidón obtenido directamente del mismo, y se emplea en algunas cervecerías debido a su menor contenido en grasas comparado con el maíz, además de por su aroma y el sabor neutro, dando lugar a cervezas más ligeras y con un sabor limpio. La temperatura de gelatinización del almidón de arroz es elevada y, por ello, los granos tienen que cocerse antes de la maceración para que se produzca la licuación de su almidón (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2.1.3. Sorgo

El sorgo (*Sorghum vulgare*) se emplea como adjunto en África y Latinoamérica para la fabricación de cervezas artesanales (por ej.: “*Kaffir*”), ya que tiene la ventaja de ser un cereal que puede sobrevivir bajo condiciones extremas de estrés hídrico. Su composición química es similar a la del maíz, no obstante, su temperatura de gelatinización es algo superior (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2.1.4. Trigo

Tradicionalmente, el trigo (*Triticum aestivum*) se ha utilizado para la elaboración de cervezas tipo “*lambic*” y “*blanche*” (sección II.1.5) en las que puede constituir hasta un 75% del cereal empleado. Por otra parte, la sobreproducción de trigo en los países industrializados ha planteado también la posibilidad de utilizar este cereal en la fabricación de otros tipos de cerveza y, por ello, puede utilizarse en cervecería en forma de harina de trigo (libre de gluten), copos de trigo, almidón purificado y trigo torrefactado (el grano es sometido a 260°C para la pregelatinización del almidón y desnaturalizar la mayor parte de las proteínas). Su composición química es muy similar a la del maíz y su temperatura de gelatinización es semejante a la de la malta cervecera, por lo que puede añadirse directamente a la caldera de cocción, aunque en la mayoría de los casos se haga por separado (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2.1.5. Cebada

La cebada puede utilizarse sin maltear como adjunto en forma de copos, almidón purificado y grano torrefacto. En general, no se han observado diferencias organolépticas significativas entre cervezas fabricadas sólo con malta o suplementadas con cebada (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2.1.6. Otros

También pueden emplearse como adjuntos sólidos centeno, avena, patata, mandioca, tapioca, “*cassava*” y azúcares de caña y remolacha, no obstante, debido a su elevado precio o a problemas organolépticos y/o tecnológicos, los resultados, en la mayoría de los casos, no han sido satisfactorios (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.2.2. Adjuntos líquidos

En la fabricación de cerveza también pueden utilizarse jarabes líquidos (solución de carbohidratos fermentables). Así pues, los jarabes de glucosa, caña de azúcar, azúcares invertidos, etc., se suelen añadir a la caldera de cocción del mosto o en los procesos postfermentativos. En algunas ocasiones, se emplean como adjuntos líquidos el caramelo (mezcla de azúcar quemado y melanoidinas), que aportan color a la cerveza (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.3. LÚPULO

Desde el inicio de la fabricación de la cerveza se han buscado hierbas, frutas o especias que, añadidas al producto final o durante su elaboración, dieran lugar a cervezas con olores y/o sabores agradables. Entre todas éstas, se impuso el lúpulo, ya que confiere un aroma y amargor deseable a la

cerveza y, además, contribuye a la estabilidad de la espuma, a la claridad de la cerveza y a su estabilidad microbiológica (Sakamoto y Konings, 2003). El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta trepadora perenne perteneciente a la familia de las *Cannabaceas* que se cultiva sólo en climas templados. La planta que se cultiva por su interés en cervecería es la femenina, de la que se aprovechan sus flores (conos), cuyo valor comercial reside en unas pequeñas glándulas doradas de lupulina ricas en resinas amargas (humulonas o α -ácidos) y aceites esenciales. Una vez obtenidos los conos, debe procederse a su secado para reducir la cantidad de humedad desde el 80% a un 8–10% y, a continuación, los conos desecados deben almacenarse a bajas temperaturas y categorizarse con base en su aspecto, aroma y contenido en α -ácidos (Hough, 1990; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Estrany *et al.*, 2007).

La composición de los lúpulos comerciales es la siguiente (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003):

1. Humulonas (α -ácidos) (2–15%). Son los componentes responsables de proporcionar el sabor amargo típico de la cerveza. Durante la ebullición del mosto, las humulonas son isomerizadas para formar isohumulonas y los compuestos generados (iso- α -ácidos) son mucho más amargos pero con un amargor más fino y son más solubles que los α -ácidos originales. Asimismo, los iso- α -ácidos ejercen un efecto bactericida o bacteriostático frente a la mayoría de los microorganismos alterantes de la cerveza (sección II.1.6).
2. Lupulonas (β -ácidos) (2–9,5%). Son compuestos cristalinos e incoloros, muy relacionados estructuralmente con las humulonas pero con escaso valor en la producción de la cerveza. Estos ácidos pueden ser oxidados durante la ebullición dando lugar a compuestos más amargos.
3. Resinas (5–24%). Son compuestos que ejercen un efecto bacteriostático frente a las bacterias Gram-positivas, principales contaminantes de la cerveza (sección II.1.7.1). No obstante, grandes cantidades de este compuesto dan lugar a un excesivo sabor amargo de la cerveza.
4. Aceites esenciales (0,03–2%). Son compuestos que contribuyen al sabor y olor final de la cerveza, no obstante, la mayor parte de los aceites se pierden durante la cocción por destilación.
5. Proteínas (12–18%). Su importancia en la elaboración de cerveza es despreciable.
6. Polifenoles, lípidos y ceras (0,5–5%). Los polifenoles participan en el sabor y color de la cerveza ya que mediante su combinación con los taninos y materias nitrogenadas complejas precipitan y dan lugar a un sabor astringente. Además, estos compuestos también posee un efecto antioxidante. Sin embargo, los lípidos y ceras no poseen un papel importante en la elaboración de la cerveza.
7. Cenizas (5–9%). La composición mineral de lúpulo depende de la composición del suelo en el que éste crece, el fertilizante empleado, las condiciones de cultivo, etc. La presencia de un exceso de nitratos favorece la formación de compuestos nitrosos no volátiles indeseables durante la fabricación de la cerveza.
8. Carbohidratos solubles (10–20%).
9. Humedad (8–12%).

El lúpulo puede adicionarse a la cerveza en forma de: (i) conos de lúpulo desecados y prensados y/o (ii) derivados del lúpulo como pastillas y extractos. Las pastillas son fáciles de conseguir y presentan la ventaja de que el lúpulo puede utilizarse en la mezcla deseada, además, son fáciles de pesar y dispersar y se conservan mejor. Por otra parte, para la extracción del lúpulo se utilizan una gran variedad de disolventes (por ej.: nafta y dióxido de carbono supercrítico) que producen excelentes extractos, y se caracterizan por ser el mejor sistema para extraer iso- α -ácidos puros con el objeto de adicionarlos en la etapa de postfermentación, suprimiendo así las pérdidas de sustancias amargas que se producen durante la ebullición del mosto y la fermentación (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.3.4. LEVADURA CERVECERA

Las levaduras son hongos, generalmente unicelulares, que se reproducen vegetativamente por gemación. *Saccharomyces* spp. es uno de los aproximadamente 40 géneros de levaduras ascosporógenas que se conocen, en el que se incluyen siete especies, entre las que se encuentran las levaduras más habitualmente utilizadas en la industria alimentaria: (i) *Saccharomyces cerevisiae*, empleada en las fermentaciones del vino, pan, cerveza tipo “ale” (sección II.1.5) y sake; (ii) *Saccharomyces bayanus*, utilizada en las fermentaciones del vino y la sidra y (iii) *Saccharomyces pastorianus* (también denominada *Saccharomyces carlsbergensis*), empleada en la fermentación de la cerveza tipo “lager” (sección II.1.5) (Sanchís *et al.*, 2000; Naumova *et al.*, 2005; Rainieri *et al.*, 2006). Las células vegetativas de estas levaduras son redondas, ovales o cilíndricas y su tamaño varía entre especies, cepas e incluso entre cultivos de una cepa pura. La célula está rodeada por una pared rígida y sobre su pared interna descansa la membrana celular. Conectándose con esta membrana se extiende en el citoplasma el retículo endoplasmático, que es un sistema membranoso que está conectado con la membrana nuclear que forma el límite del núcleo. Asimismo, en el citoplasma de las levaduras se encuentran otros orgánulos como las mitocondrias y vacuolas. Por otra parte, todas las especies de este género se reproducen por gemación multipolar (la gemación puede producirse en cualquier lugar de la superficie celular) y durante el proceso se produce la división del núcleo y la producción de orgánulos que se distribuirán entre la célula madre y la yema. Cuando sobresale una yema sobre la pared celular de la madre deja una cicatriz y, en teoría, la superficie de la pared celular de una célula madura es suficiente para un centenar de yemas, pero en la práctica no se han observado más de 50 cicatrices (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003). Finalmente, la característica fisiológica más importante y por la que se reconoce a las especies del género *Saccharomyces* es su capacidad de fermentar enérgicamente, en condiciones de anaerobiosis o semianaerobiosis, uno o más azúcares produciendo etanol. Los azúcares fermentables son D-glucosa, D-fructosa y D-manosa, y la gran mayoría de las especies de este género pueden utilizar D-galactosa, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Sanchís *et al.*, 2000).

Las diferencias existentes en la estructura química de la pared celular de las levaduras son las responsables de que algunas asciendan a la parte superior del mosto al final del proceso de fermentación, y a estas levaduras se les denomina “altas o ale”, ya que son las responsables de la fermentación alta. La superficie celular de estas levaduras está cubierta por pequeñas protuberancias

microfibrilares que les confieren una aspereza que permite que las células asciendan a la superficie durante la fermentación. Sin embargo, existen otras levaduras que se depositan en la parte inferior del tanque al final de la fermentación, y se les denomina “bajas o *lager*”, y al proceso de fermentación se le denomina fermentación baja (sección II.1.5). A este respecto, las células de algunas levaduras forman yemas durante la reproducción asexual que, en gran número de casos, no se separan de la célula madre sino que forman cadenas constituidas por numerosas células que sedimentan rápidamente. Asimismo, otras cepas son floculantes, es decir, las células se atraen entre sí mediante puentes de calcio e hidrógeno y se forman flóculos o agrupaciones de un gran número de células que sedimentan en el fondo del tanque (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

Por otra parte, las necesidades nutritivas para el crecimiento de las levaduras de cervecería son las siguientes (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000):

1. Fuente de carbohidratos fermentables (por ej.: glucosa, maltosa y maltotriosa) para la obtención de energía y carbono para la biosíntesis de su citoesqueleto.
2. Fuente de nitrógeno para la síntesis de proteínas. Los iones amonios son suficientes para el desarrollo normal de la levadura, no obstante, si se presentan junto con aminoácidos, el crecimiento de la levadura es más rápido.
3. Factores de crecimiento (vitaminas) e iones inorgánicos. La biotina es la vitamina más común empleada por las levaduras para su crecimiento. Las necesidades de minerales son semejantes a las de otros microorganismos y desempeñan un papel estructural y/o enzimático.
4. Oxígeno. La fermentación del mosto en la producción de cerveza es un proceso anaeróbico, no obstante, cuando se inocula o siembra la levadura en el mosto existe una necesidad precisa de oxígeno. La levadura, en ausencia de oxígeno, es incapaz de sintetizar esteroides y otros ácidos grasos insaturados que son esenciales como componentes de la membrana celular. A los 2–3 días del inicio de la fermentación el oxígeno está agotado y, a partir de este momento, el proceso es anaeróbico y la producción de etanol entra en fase exponencial.

Las levaduras cerveceras no sólo son responsables de la conversión de azúcares fermentables en etanol y dióxido de carbono, sino que también producen compuestos responsables del sabor, tales como los alcoholes superiores y ésteres, y pueden realizar otra serie de actividades que permitan mejorar la producción de cerveza (Estrany *et al.*, 2007). Así pues, las propiedades tradicionales que se valoran en una buena levadura cervecera son, entre otras, las siguientes (Sanchís *et al.*, 2000):

1. Velocidad corta de fermentación sin un excesivo crecimiento celular.
2. Utilización eficiente de maltosa y maltotriosa con una buena conversión a etanol.
3. Capacidad para resistir el estrés provocado por la concentración de etanol y la presión osmótica de la cerveza.
4. Reproducibilidad de los compuestos responsables del aroma y sabor dentro de los niveles correctos que se dan en la cerveza.
5. Floculación adecuada según el proceso de elaboración de cerveza empleado.
6. Buena viabilidad de la levadura durante el almacenamiento y estabilidad genética.

A este respecto, las levaduras cerveceras presentan, de forma general, una gran estabilidad genética ya que carecen de ciclo sexual y una célula crecerá y producirá una población de células genéticamente idénticas o clones. Estos clones retienen sus características cerveceras y son capaces de producir una fermentación reproducible y, por ello, el cervecero podrá emplear este cultivo puro mediante conservación en un laboratorio y propagarlo hasta obtener una cantidad suficiente para inocular un tanque de mosto para fermentar. Las primeras fases de la propagación se realizan en el laboratorio y el resto en una pequeña planta piloto o sistema propagador de la industria cervecera bajo condiciones similares a las de la cervecería. En cada fase se aumenta aproximadamente 10 veces el número de células de levaduras y, para ello, se suele utilizar mosto cervecero que se ha tratado térmicamente (ebullición durante 30 min o pasteurización). Por otra parte, es importante determinar la cantidad de células viables presentes en un inóculo con el fin de controlar la cantidad de levaduras añadidas a un fermentador para conseguir que la fermentación sea reproducible. Existen diversas técnicas para determinar la viabilidad de la levadura, no obstante, la más utilizada consiste en el empleo de azul de metileno en una solución tamponada (pH 5). Al poner en contacto una suspensión celular con unas gotas de azul de metileno, las células muertas se vuelven azules mientras que las vivas permanecerán sin colorearse. La fiabilidad de este método es bastante buena, sobre todo si se trabaja con poblaciones con viabilidades superiores al 85% (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003).

II.1.3.5. AGUA

La cerveza es una bebida compuesta por un 85–95% de agua lo que indica claramente el papel decisivo que juega este compuesto en la calidad del producto final. Antiguamente, las fábricas de cerveza se construían en los lugares que podían ser capaces de suministrar agua de una calidad óptima y de forma continua. El tipo de agua que surtía a la factoría influía directamente en el tipo de cerveza fabricada, encontrándose así el caso de aguas blandas que en Eslovaquia producían las cervezas “*pilsner*”, frente a las aguas duras que caracterizaban cervezas más oscuras como las típicas de Londres o Dublín. Los progresos en los análisis químicos de las aguas han permitido conocer la composición iónica de las aguas naturales y desarrollar métodos para conservar sus características físico-químicas durante todo el año. Así pues, se idearon formas de ablandar aguas duras y de controlar tanto el pH como la concentración de determinados iones importantes en las características organolépticas finales de la cerveza (Hough, 1990; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003). A este respecto, la importancia de la presencia de iones calcio, magnesio y bicarbonato en el agua radica en los siguientes aspectos (Sanchís *et al.*, 2000):

1. Cuando se cuece el mosto, el bicarbonato libera dióxido de carbono tomando iones de hidrógeno y aumentando el pH. Este hecho es contrarrestado ya que la malta proporciona ácido fosfórico, que se ioniza rápidamente y libera iones de hidrógeno. En presencia de iones de calcio se forma fosfato cálcico que es muy insoluble y precipita, induciendo la disociación de más moléculas de ácido fosfórico, se liberan más iones de hidrógeno y el pH del mosto va descendiendo. Esta disminución del pH es importante ya que un pH elevado durante la fabricación de la cerveza es desfavorable

debido a que: (i) la sacarificación es peor, (ii) el rendimiento es más débil, (iii) la coagulación de las materias nitrogenadas en la ebullición no es completa, (iv) el lúpulo es más amargo y (v) estas cervezas son más sensibles al desarrollo de bacterias lácticas.

2. La α -amilasa (sección II.1.4.2.2) no actúa en ausencia de iones calcio.
3. El bajo pH favorece la actividad de la β -amilasa y algunas peptidasas (sección II.1.4.2.2) y dificulta la extracción de compuestos que pueden colorear la cerveza, obteniéndose así cervezas menos astringentes y coloreadas.
4. Las levaduras flocculan mejor en presencia de iones calcio, favoreciendo la clarificación del mosto y de la cerveza.
5. Una cantidad adecuada de calcio en el mosto elimina el exceso de oxalato durante el almacenamiento de la cerveza, evitando la turbidez originada por este compuesto.
6. El ión magnesio reduce el pH en menor medida que el ión calcio, no obstante, el magnesio es un cofactor necesario para el funcionamiento de enzimas de las levaduras.

Además, en la composición química del agua existen otros iones que tienen importancia en el proceso de elaboración de la cerveza, entre los que destacan los que se citan a continuación (Sanchís *et al.*, 2000):

1. Sodio. Contribuye al sabor de la cerveza con un aporte salado y acre.
2. Potasio. Posee un efecto salino y la proporción potasio/calcio afecta a la floculación de las levaduras.
3. Sulfatos. Afectan positivamente a la degradación de las proteínas y el almidón e influyen sobre la sequedad de la cerveza. La adición de iones sulfato al agua incrementa el aroma del lúpulo.
4. Hierro. Tiene un efecto negativo durante la producción del mosto y la cerveza debido a que afecta adversamente a la levadura, así como al color, sabor y estabilidad coloidal.
5. Cobre. Concentraciones superiores a 10 ppm resultan tóxicas para la levadura y pueden producir enturbiamiento de la cerveza.
6. Manganeso. Posee un efecto positivo en la solubilización de las proteínas pero inhibe el crecimiento de las levaduras e influye negativamente en la estabilidad coloidal.
7. Amonio. Indica que el agua puede estar contaminada con materia orgánica.
8. Cloruros. Dan lugar a cervezas más esponjosas y dulces aunque en exceso pueden aportar un sabor salado. Asimismo, puede provocar fermentaciones incompletas, clarificaciones defectuosas y afectar al sabor de la cerveza.
9. Nitratos y nitritos. La levadura cervecera puede transformar los nitratos en nitritos dando lugar a un mal sabor de la cerveza. Asimismo, los nitritos pueden reaccionar con los taninos observándose un color rojizo en la cerveza.
10. Zinc. Tiene un efecto beneficioso durante la fermentación para la síntesis de proteínas, crecimiento de levaduras, estimulación de la fermentación e inhibición de la formación de anhídrido sulfuroso; no obstante, su exceso provoca efectos adversos sobre la fermentación y estabilidad coloidal.

II.1.3.6. ADITIVOS

El Código Alimentario Español, en el capítulo XXXI, define a los aditivos alimentarios como sustancias que se añaden intencionadamente a los alimentos y bebidas, sin propósito de cambiar su valor nutritivo y con la finalidad de modificar sus caracteres, técnicas de elaboración, conservación y/o para mejorar su adaptación al empleo a que se destinan. Dichas sustancias, posean o no valor nutritivo, no se consumen normalmente como alimentos ni se usan como ingredientes característicos de los mismos.

En la cerveza, y en general en todas las bebidas, los aditivos empleados desempeñan esencialmente una de las siguientes funciones: (i) facilitar el trabajo durante el proceso, (ii) aumentar la vida útil del producto terminado y/o (iii) mejorar su presentación y controlar su actividad biológica y los procesos químicos (Multon, 2000). A este respecto, durante la elaboración de cerveza en España pueden utilizarse una serie de aditivos (Tabla II.1) y coadyuvantes tecnológicos que aparecen en las listas positivas de aditivos para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización (BOE nº 11 de 12 de enero de 1996; BOE nº 19 de 22 de enero de 1996; BOE nº 44 de 20 de febrero de 2002; BOE nº 291 de 3 de diciembre de 2004), y en la Norma General del Codex para Aditivos Alimentarios (GSFA, Codex STAN 192–1995) (Anónimo, 2006b):

1. Aditivos:
 - 1.1. Colorantes. Sustancias que proporcionan, refuerzan o varían el color de los productos alimenticios.
 - 1.2. Antioxidantes. Sustancias que se añaden a los productos alimenticios para impedir o retardar las oxidaciones catalíticas y enrarecimientos naturales o provocados por la acción del aire, la luz, el calor, indicios metálicos, etc.
 - 1.3. Estabilizantes. Sustancias que impiden el cambio de forma o naturaleza química de los productos alimenticios a los que se incorporan, inhibiendo reacciones o manteniendo el equilibrio químico de los mismos.
 - 1.4. Conservantes. Sustancias que se añaden a los productos alimenticios para protegerlos de alteraciones biológicas, como fermentación, enmohecimiento y putrefacción.
 - 1.5. Edulcorantes. Sustancias que se emplean para dar sabor dulce a los productos alimenticios y/o que se utilizan como edulcorantes de mesa.
2. Coadyuvantes tecnológicos. Sustancias o materias, excluidos aparatos y utensilios, que no se consumen como ingredientes alimenticios por sí mismos, y que se emplean intencionadamente en la elaboración de materias primas, alimentos o sus ingredientes para lograr alguna finalidad tecnológica durante el tratamiento o la elaboración, pudiendo dar lugar a la presencia no intencionada pero inevitable de residuos o derivados en el producto final. En cervecería se utilizan dos tipos de coadyuvantes: (i) filtrantes y clarificantes, como celulosa, carbón activo, tierra de infusorios, tanino, albúmina, gelatina alimenticia, bentonitas, alginatos, dióxido de silicio amorfo, caseína, queratina, poliamidas y polivinilpirrolidona insoluble y (ii) preparados enzimáticos: proteolíticos y amilolíticos.

Tabla II.1. Aditivos empleados durante la elaboración de la cerveza

Referencia normativa	Tipo de aditivo	Denominación	Nº UE	Dosis máxima de empleo
R.D. 2001/1995				
	Colorante	Caramelo natural	E-150a	<i>Quantum satis</i>
	Colorante	Caramelo de sulfito cáustico	E-150b	<i>Quantum satis</i>
	Colorante	Caramelo amónico	E-150c	<i>Quantum satis</i>
	Colorante	Caramelo de sulfito amónico	E-150d	<i>Quantum satis</i>
R.D. 2002/1995; 2197/2004				
	Edulcorante	Acesulfamo potásico	E-950	350 mg/l ^a
	Edulcorante	Aspartamo	E-951	600 mg/l ^a
	Edulcorante	Neohesperidina DC.	E-959	10 mg/l ^a
	Edulcorante	Sacarina y sus sales de sodio, potasio y calcio	E-954	80 mg/l ^a
	Edulcorante	Sal de aspartamo y acesulfamo	E-962	350 mg/l ^{a, d}
	Edulcorante	Sucralosa	E-955	250 mg/l ^a
R.D. 142/2002				
	Antioxidante	Ácido ascórbico	E-300	<i>Quantum satis</i>
	Antioxidante	Ácido cítrico	E-330	<i>Quantum satis</i>
	Antioxidante	Ácido láctico	E-270	<i>Quantum satis</i>
	Antioxidante	Ascorbato sódico	E-301	<i>Quantum satis</i>
	Antioxidante	Dióxido de azufre y sulfitos	E-220–224, E-226–228	50 mg/l ^{b, d}
	Conservante	Ácido benzoico y sus sales de sodio, potasio y calcio	E-210–E-213	200 mg/l ^c
	Conservante	Dióxido de azufre y sulfitos	E-220–224, E-226–228	20 mg/l ^d ó 50 mg/l ^b
	Estabilizante	Alginato de propano–1, 2– diol	E-405	100 mg/l
	Estabilizante	Goma arábica	E-414	<i>Quantum satis</i>
Codex STAN 192–1995				
	Antioxidante	Sulfitos	E-220–225, E-227, E-228, E-539	50 mg/kg ^d ó 70 mg/kg ^{d, e}
	Antioxidante	EDTA cálcico disódico anhidro	E-385	25 mg/kg
	Colorante	Azul brillante FCF	E-133	200 mg/kg
	Colorante	Caramelo amónico	E-150c	<i>Quantum satis</i>
	Colorante	Caramelo de sulfito amónico	E-150d	<i>Quantum satis</i>
	Colorante	Carmines	E-120	100 mg/kg
	Colorante	Carotenos, Beta – (vegetales)	E-160a(ii)	600 mg/kg
	Colorante	Riboflavinas	E-101(i), (ii)	100 mg/kg
	Colorante	Verde sólido FCF	E-143	100 mg/kg
	Conservante	Ácido benzoico y sus sales	E-210–E-213	1000 mg/kg
	Conservante	Sulfitos	E-220–225, E-227, E-228, E-539	50 mg/kg ^d ó 70 mg/kg ^{d, e}
	Edulcorante	Acesulfamo potásico	E-950	350 mg/kg
	Edulcorante	Ácido ciclámico	E-952	250 mg/kg
	Edulcorante	Aspartamo	E-951	600 mg/kg
	Edulcorante	Neotamo	E-961	33 mg/kg
	Edulcorante	Sacarina y sus sales	E-954	80 mg/kg
	Estabilizante	Dimetilpolisiloxano	E-900a	10 mg/kg
	Estabilizante	Ésteres diacetiltartáricos y de ácidos grasos de glicerol	E-472e	10000 mg/kg
	Estabilizante	Polisorbatos	E-432–436	120 mg/kg
	Estabilizante	Polivinilpirrolidona	E-1201	10 mg/kg ^d

^aEn cervezas sin alcohol. ^bEn cervezas sometidas a una segunda fermentación. ^cEn cervezas de barril sin alcohol.

^dEste valor se refiere a la dosis máxima residual permitida de acesulfamo, dióxido de azufre y sulfitos o de polivinilpirrolidona.

^eEn el caso de que se adicionen anhídrido sulfuroso (E-220), sulfito sódico (E-221), sulfito ácido de sodio (E-222), metabisulfito sódico (E-223), metabisulfito potásico (E-224), sulfito de potasio (E-225), sulfito ácido de calcio (E-227), bisulfito de potasio (E-228) y tiosulfato de sodio (E-539), la dosis máxima residual permitida de dióxido de azufre y sulfitos es de 350 mg/kg.

II.1.4. ELABORACIÓN DE LA CERVEZA

La fabricación de la cerveza consiste esencialmente en fermentar el jugo azucarado extraído de los cereales y aromatizado con lúpulo. De forma general, este proceso consta de cuatro grandes fases: (i) el malteado, (ii) la producción del mosto, (iii) la fermentación y (iv) los procesos finales (Fig. 2.2) (Linko *et al.*, 1998).

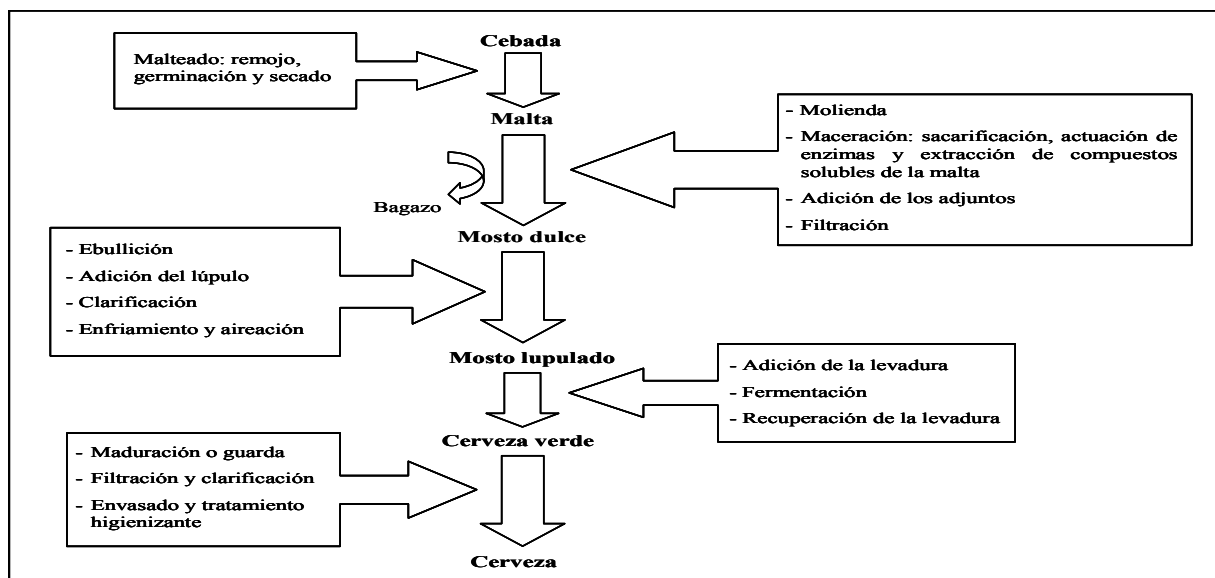


Figura 2.2. Esquema general del proceso de elaboración de la cerveza. Adaptado de Estrany et al. (2006).

II.1.4.1. MALTEADO

La cebada (sección II.1.3.1) es la materia prima fundamental de la cerveza, sin embargo, no constituye un extracto fermentable para la levadura. Por ello, en los procesos desarrollados en las malterías el objetivo fundamental es que el grano de cebada adquiera unas condiciones de humedad y temperatura necesarias para que el grano desarrolle un sistema enzimático capaz de desagregar las macromoléculas que lo componen y, así, facilitar que pueda asimilarse su reserva alimenticia que es el almidón presente en su endospermo. A este respecto, la malta es el producto de la transformación de los granos de cebada y se obtiene mediante tres procesos básicos: (i) remojo, (ii) germinación y (iii) secado (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003; Estrany *et al.*, 2007).

II.1.4.1.1. Remojo

La cebada, una vez clasificada y limpia, se remoja en agua a 10–15°C para aumentar su humedad hasta el 35–48%, permitiendo así que la cáscara o envoltura del grano adquiera una mayor plasticidad y se mantenga más entera después de la molturación. Para ello, la cebada se deja caer en unos tanques de remojo en los que se permite el contacto del grano con agua en condiciones aeróbicas, eliminándose las cascarillas y el polvo de la cebada. El remojo se interrumpe a las 12–24 h, y los granos quedan recubiertos únicamente de una fina película de agua a través de la que puede disolverse el oxígeno de la atmósfera que les rodea. A este paso se le denomina periodo seco o periodo bajo aire y dura varias horas, tras las que se sumergen de nuevo los granos mediante el llenado de los tanques con agua limpia. Los periodos de remojo y seco se van alternando hasta que el grano alcanza la humedad deseada. En esta fase, una buena aireación del agua y las etapas de descanso son indispensables, ya que el agotamiento del oxígeno del agua de remojo puede llevar a desencadenar un metabolismo anaerobio no deseado. Así pues, la aireación del agua de remojo se realiza con aire comprimido y su cantidad debe ir incrementándose conforme avanza la activación del embrión (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003).

II.1.4.1.2. Germinación

Una vez finalizado el remojo de los granos de cebada se procede a transferir los granos al equipo de germinación en el que germinarán bajo las condiciones óptimas de temperatura, humedad y aireación. El grano remojado se extiende sobre un suelo de malteo impermeable formando un lecho de unos 25 cm de espesor y, mediante ventiladores, se inyecta aire a 12–15°C para mantener la temperatura del grano entre 15–21°C ya que, durante su respiración, genera un calor considerable. Con el objetivo de mantener la temperatura y humedad de los granos constante, la capa de granos se mueve periódicamente y se somete a duchas de agua para compensar las pérdidas debidas a la evaporación. Este proceso dura aproximadamente seis días y sus objetivos principales son: (i) la creación e incremento del sistema enzimático del grano; (ii) la degradación paulatina de las macromoléculas que contiene y, en particular, de la matriz proteica (que rodea a los gránulos del almidón) y los β -glucanos que son el componente mayoritario de las paredes celulares del endospermo y (iii) el crecimiento de las raicillas del grano que denotan el avance de la germinación (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003).

II.1.4.1.3. Secado

La germinación de los granos de cebada se detiene mediante el secado de los mismos, un proceso que implica el secado y tostado de los granos reduciendo su contenido de humedad desde un 45–50% hasta el 2–5% (dependiendo del tipo de cerveza fabricada) mediante un proceso gradual de calentamiento ascendente con diferentes patrones de temperatura. Inicialmente, se elimina el agua superficial del grano con una temperatura menor y, posteriormente, se eleva para eliminar el agua incorporada en el grano. En esta fase, que correspondería al tostado, se destruyen algunas enzimas creadas durante la germinación y se modifica el aroma y el color de la malta mediante reacciones de Maillard que conllevan la formación de sustancias oscuras y de sabores característicos importantes para las cualidades de la cerveza. Por otra parte, dependiendo del tipo de cerveza, la temperatura empleada en el tostado de la malta es diferente; así pues, para cervezas doradas o pálidas se utilizan maltas poco tostadas (55–80°C), en cambio, las cervezas negras, más o menos oscuras, se fabrican con maltas tostadas a temperaturas más elevadas de hasta 95–110°C. Finalmente, las raíces de los granos tostados se eliminan por fricción mediante un proceso mecánico denominado desgerminación. A partir de este momento, el grano, que ya se denomina malta, está dispuesto para la elaboración de la cerveza (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003; Coghe *et al.*, 2006; Sánchez, 2006).

II.1.4.2. PRODUCCIÓN DEL MOSTO CERVECERO

La fabricación de mosto cervecero no tiene que realizarse únicamente con malta sino que también pueden emplearse otros cereales o granos crudos (por ej.: maíz y arroz), ya que aportan una cantidad importante de carbohidratos y regulan el nivel de proteínas (sección II.1.3.2). El objetivo principal de esta fase es la obtención de un mosto dulce que, posteriormente, será aromatizado con lúpulo y que debe obtenerse con el mayor grado de eficiencia posible mediante la extracción de las materias primas

empleadas. Para ello, la malta y los adjuntos cerveceros se procesarán en un principio por separado (Novell y Raventós, 2003).

II.1.4.2.1. Molienda

Tras la recepción de la malta y los adjuntos en la industria cervecera, el material se pesa y criba y se hace pasar a través de separadores magnéticos con el fin de eliminar el polvo y las posibles partículas metálicas. A continuación, la malta se tritura, reduciendo el endospermo del grano a un tamaño de partícula que asegure una correcta hidratación de las partículas en el proceso de extracción y una buena liberación de las enzimas que han de degradarla. En esta fase, la cascarilla no debe triturarse en exceso, ya que así servirá más eficazmente a la filtración posterior del mosto y liberará menos taninos no deseables (debido a su astringencia y sabor anómalo) al mosto obtenido. Para la molienda de la malta pueden emplearse dos tipos de molinos: secos y húmedos. En los molinos húmedos, la malta se rocía con agua o se somete a la acción del vapor, lo que ocasiona un humedecimiento del grano que hace que la cascarilla sea más flexible y se triture menos durante la molienda. No obstante, en ambos casos, los molinos generan maltas trituradas con diferentes tamaños de partícula obteniéndose un producto de molienda que es una mezcla de cascarilla, sémolas gruesas y finas y harina (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003).

II.1.4.2.2. Maceración

El objetivo principal de la maceración es la obtención de un líquido o extracto, a partir de la malta y otros adjuntos, que posea la mayor cantidad posible de sustancias solubles en agua (por ej.: azúcares, aminoácidos y proteínas) y que pueda servir finalmente para la obtención, mediante fermentación con levadura cervecera, de un líquido alcohólico con un perfil organoléptico específico. A este respecto, el extracto seco primitivo es el conjunto de ingredientes orgánicos disueltos en agua, antes de la fermentación, medidos como equivalentes de sacarosa. De forma general, un grado plato (°Plato) equivale a 1 g de sacarosa en 100 g de líquido (Sanchís *et al.*, 2000; Estrany *et al.*, 2007).

Durante esta etapa, el control del pH es esencial dado que: (i) afecta a la actividad relativa de las enzimas, (ii) controla, en parte, la cantidad de productos extraídos, como los taninos y las resinas amargas de la cáscara de la cebada, e (iii) influye sobre el color de los extractos y la facilidad con la que se realiza la clarificación y filtración posteriores. Asimismo, la temperatura empleada es otro factor importante que también influye en la actividad de las enzimas (Sanchís *et al.*, 2000).

En la caldera de maceración se introduce todo el contenido de la molienda y se realizan una serie de ciclos de calentamiento y reposo térmico para conseguir la sacarificación del mosto cervecero, obteniéndose así el denominado mosto dulce. Las principales enzimas que actúan en esta fase son (Tabla II.2) las fosfatasas, proteasas y amilasas (α y β), que continúan las transformaciones que ya se habían iniciado durante el malteado. Al poner en contacto la molienda con el agua de maceración, aproximadamente un 15% de los compuestos se solubilizan de manera natural, mientras que el resto se solubilizarán vía enzimática tras la adición de diversas enzimas. El empaste formado se encuentra a una temperatura de 40–50°C y, a continuación, tiene lugar la etapa denominada reposo de las proteínas. En

este momento se solubilizarán las proteínas descomponiéndose en moléculas más pequeñas como peptonas y polipéptidos. La enzima peptidasa es la encargada de degradar el grupo de peptonas a péptidos y aminoácidos, lo que constituye una etapa fundamental ya que estos compuestos son la fuente de nitrógeno asimilable por la levadura. Posteriormente, la temperatura se eleva hasta 62–72°C (con la transferencia de adjuntos) y se produce la acción de las enzimas amilolíticas, en particular α - y β -amilasa. Estas enzimas actúan sobre las cadenas de almidón, hidrolizándolas hasta maltosa, maltotrina y α -dextrinas. Seguidamente, la temperatura de la masa se eleva hasta 75°C y se produce un aumento de la sacarificación con formación de dextrinas y azúcares fermentables en menor grado (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003; Estrany *et al.*, 2007). En esta etapa, la masa, previa comprobación con yodo de que la sacarificación ya ha finalizado, queda lista para proceder a su filtración.

Tabla II.2. Principales enzimas que actúan durante la maceración de la malta

Enzima	pH óptimo	T ^a óptima (°C)	T ^a inactivación (°C)	Compuestos afectados
α -amilasa	5,3–5,8	70–75	75–80	Almidón
β -amilasa	5,2–5,6	63–65	68–70	Almidón
Dextrinasa	5,0–5,5	55–60	65	Almidón
Aminopeptidasas neutras	7,0–7,2	45	>55	Compuestos nitrogenados
Carboxipeptidasas	4,8–5,6	50	>70	Compuestos nitrogenados
Metalo-endopeptidasas	5,5–8,5	45–50	70	Compuestos nitrogenados
Leucina aminopeptidasas	8,0–10,0	45–50	>55	Compuestos nitrogenados
Sulfidril-endopeptidasas	3,9–5,5	45–50	70	Compuestos nitrogenados
Dipeptidasa	8,8	40–45	>50	Dipéptidos neutros
α -glucosidasa	4,5	N.D. ^a	N.D.	Maltosa
Carboxipeptidasa ácida	6,35	60	73	Protein- β -glucanos
Sacarasa	5,5	50	55	Sacarosa
Endo- β -1,4-glucanasa	4,5–4,8	37–45	55	β -glucanos
Endo- β -1,3-glucanasa	4,6–5,5	60	70	β -glucanos
Endo- β -glucanasa de cebada	4,7–5,0	40	63	β -glucanos

^aN.D. No descrito. Adaptado de Sanchís *et al.* (2000).

Los adjuntos cerveceros o granos crudos (sección II.1.3.2) constituyen un 25–30% de la cantidad total empleada para la fabricación del mosto. El almidón procedente de estos granos crudos (principalmente arroz y maíz en forma de sémola) se modifica con mayor dificultad que el de la malta y, por ello, se procesan inicialmente por separado. El grano crudo se someterá a un proceso de molturación, para hacerlo más accesible a la acción enzimática, mediante la adición de: (i) una pequeña cantidad de malta a la caldera de granos crudos y/o (ii) enzimas externas de origen bacteriano o fúngico. Seguidamente, se añade una cierta cantidad de agua sobre los granos crudos y se aumenta gradualmente la temperatura. De este modo, los gránulos del almidón absorben el agua, se hinchan, la masa se espesa y se produce la gelatinización. Posteriormente, los gránulos de almidón revientan por acción de las enzimas y se esparcen por toda la masa, se eleva la temperatura hasta la ebullición y se produce la licuefacción completa. Tras un periodo de ebullición de 15–30 min se transfiere la masa a la caldera de maceración para continuar el proceso de conversión de todo el almidón con las dos masas juntas (Novell y Raventós, 2003).

II.1.4.2.3. Filtración

El objetivo de esta etapa es la separación del mosto líquido (mosto dulce) de la parte insoluble, denominada bagazo, para la obtención de un mosto que posea una baja turbidez. La obtención de este mosto se realiza a partir del mosto principal y de los lavados subsiguientes del bagazo (2 ó 3), que permiten recuperar todo el extracto retenido en el mismo. El mosto que contiene la caldera de maceración está aproximadamente a 75°C y completamente sacarificado, y como este mosto es un fluido viscoso es habitual aumentar ligeramente la temperatura (aprox., 2°C) en la caldera, antes de bombearlo a la cuba filtro, disminuyendo así su viscosidad y mejorando su filtrabilidad. Para la filtración del mosto los principales sistemas empleados son cuba filtro y filtro prensa. Este último, tiene la ventaja de que ocupa menos espacio y permite obtener un mosto de calidad prácticamente igual, además de que posibilita un mayor rendimiento y un mayor número diario de cocciones (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003).

II.1.4.2.4. Ebullición

Una vez filtrado el mosto dulce debe procederse a su ebullición, cuyos objetivos principales son los siguientes (Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003):

1. Inactivación de las enzimas, especialmente de la α -amilasa que es la más resistente a las altas temperaturas.
2. Esterilización del mosto.
3. Concentración del mosto mediante la evaporación del agua. En el proceso de filtración, los lavados del bagazo han diluido el mosto principal y el mosto final se introduce en la caldera de ebullición con un °Plato inferior al que debe tener. Con la evaporación, se consigue llegar al nivel °Plato exacto, no obstante, si se llegara a la concentración antes del final del período de ebullición las instalaciones modernas disponen de medidores de extracto en línea que permiten conocer el °Plato al final de la ebullición y dosificar el agua necesaria para corregir un exceso en la concentración.
4. Destilación de los compuestos volátiles indeseables como el dimetilsulfuro, los aldehídos y los compuestos azufrados.
5. Formación de los compuestos procedentes de las reacciones de Maillard, produciéndose color por caramelización de azúcares, formación de melanoidinas y oxidación de taninos, con la consiguiente formación de compuestos volátiles que generan aromas diversos.
6. Coagulación de las proteínas y los taninos.
7. Disminución del pH (pH final promedio de 5,3), debido a la precipitación del fosfato cálcico.
8. Formación de compuestos reductores.
9. Adición del lúpulo al mosto dulce con los siguientes efectos principales: (i) aportación de sabores amargos, procedentes de las humulonas del lúpulo, mediante isomerización de los α -ácidos a iso- α -ácidos, (ii) adición de aceites esenciales y taninos, (iii) reducción de la tensión superficial debida a estos aceites y (iv) mejora de la espuma de la cerveza por la presencia de los iso- α -ácidos.
10. Fijación de los perfiles de azúcares, proteínas, lípidos, polifenoles, etc.

La ebullición del mosto se lleva a cabo en calderas durante 60–90 min y, generalmente, a presión atmosférica con agitación, aunque puede realizarse también a presión positiva, con la consiguiente liberación de compuestos volátiles al final del proceso. Asimismo, conviene que todo el mosto se encuentre en movimiento continuo para que no existan diferencias de temperatura entre la parte superior y el fondo de la caldera.

II.1.4.2.5. Clarificación, enfriamiento y aireación

La clarificación del mosto se realiza en “tanques remolino” o “*whirlpool tanks*” y consiste en la eliminación de: (i) los conos de lúpulo empleados, así como de las partículas que ellos hayan generado, (ii) los residuos que puedan quedar si se emplean pastillas de lúpulo y/o (iii) la turbidez formada durante la cocción. Para ello, el mosto lupulado se bombea desde la caldera de ebullición y entra en el “tanque remolino” tangencialmente, generando un movimiento de rotación, y decantándose en el fondo y centro del tanque las partículas que han precipitado en la caldera de ebullición. Para asegurar este efecto remolino es importante la velocidad de entrada y la altura por la que se introduce el mosto lupulado, ya que si se coloca muy bajo se reduce el efecto de rotación y si se coloca muy alto aumenta la oxidación del mosto. Una vez clarificado, el mosto se dirige hacia los tanques de fermentación con una temperatura de, aproximadamente, 100°C, sin embargo, el mosto debe enfriarse a 10–12°C. Para ello, se emplean intercambiadores de calor de placas, en los que los refrigerantes utilizados suelen ser agua a 10–15°C, amoníaco, salmuera refrigerada o glicol. En el caso de que se emplee agua, su temperatura aumenta hasta 75–80°C y puede utilizarse posteriormente para la limpieza y, a veces, la maceración. Finalmente, dado que las levaduras cerveceras requieren oxígeno para su crecimiento, se produce la aireación u oxigenación del mosto una vez enfriado para evitar su oxidación. La aireación u oxigenación se realiza mediante la inyección de aire u oxígeno estéril, llegando a valores de 8 a 10 mg/l. A partir de este momento, el mosto oxigenado ya está preparado para que se lleve a cabo el proceso de fermentación alcohólica por parte de la levadura cervecera (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003; Novell y Raventós, 2003).

II.1.4.3. FERMENTACIÓN

La fermentación alcohólica constituye el fenómeno biológico principal para la obtención de la cerveza y consiste en una serie de actividades metabólicas de la levadura por medio de las que el mosto lupulado se transforma en cerveza verde. Este mosto contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de la levadura, entre los que se incluyen carbohidratos (50–60% de maltosa, 15–20% de maltotriosa y 10–15% de glucosa), fuentes de nitrógeno (aminoácidos) y una gran cantidad de minerales (Jespersen *et al.*, 1999; Sanchís *et al.*, 2000). A partir de estas sustancias nutritivas, la levadura produce los principales componentes del sabor de la cerveza como subproductos de la actividad metabólica necesaria para su propio crecimiento celular (Sanchís *et al.*, 2000; Estrany *et al.*, 2006). La fermentación alcohólica se inicia al adicionar la levadura seleccionada (0,5–1,0 l de levadura por hl de mosto) al mosto lupulado y aireado, tiene lugar a una temperatura de 10–20°C, dura entre 5–10 días y consta de las siguientes etapas (Sanchís *et al.*, 2000):

1. En primer lugar, se produce una etapa de latencia (aprox., 24 h), en la que la levadura permanece inactiva absorbiendo oxígeno, aminoácidos, péptidos y sales minerales.
2. A continuación, tiene lugar la fase de crecimiento y fermentación, en la que la levadura se multiplica rápidamente y empiezan a transformarse los azúcares. En esta fase, la vía principal de producción de energía en la levadura es la fermentación alcohólica, ya que la vía aeróbica o respiración, cuyo rendimiento de energía es muy superior al de la fermentación, está inhibida por la ausencia de oxígeno. La forma más simple de expresar la fermentación alcohólica es la ecuación de Gay-Lussac: $\text{glucosa} \rightarrow 2 \text{ dióxido de carbono} + 2 \text{ etanol} + \text{energía (ATP, del inglés Adenosine Tri-Phosphate)}$.
3. Posteriormente, se produce la etapa de fermentación sin crecimiento (fase estacionaria) en la que la multiplicación cesa pero la masa celular continúa creciendo debido a la acumulación interna de glucógeno. En esta etapa, aparecen los ésteres y alcoholes superiores y, simultáneamente, los azúcares se agotan lentamente.
4. Finalmente, tiene lugar la etapa de floculación, en la que la levadura se deposita en el fondo del tanque, en el caso de la fermentación baja, o en la superficie, en el caso de la fermentación alta.

Una vez finalizada la fermentación, la levadura se somete a un proceso de separación que conducirá a la obtención de la cerveza verde. Conviene destacar que la levadura recuperada posee muy buenas características para reutilizarse en fermentaciones posteriores haciéndose innecesarias la producción continua de cultivos puros. Para ello, se desea que la levadura no sea pulverulenta, es decir, que flocule mal ya que en este caso el único modo de recuperar la levadura sería mediante centrifugación, lo que resulta poco aconsejable ya que produce un gran deterioro celular. Esta levadura se conservará en refrigeración (0–4°C) en soluciones tamponadas, en cerveza o incluso en mosto. Otra forma de conservación es la levadura prensada que suele contener un 75% de humedad y puede guardarse a 0°C. Durante el periodo de almacenamiento, es importante asegurarse de que la viabilidad de la levadura disminuya lo mínimo posible y, para ello, conviene minimizar el tiempo de permanencia en los tanques de almacenamiento (Sanchís *et al.*, 2000; Estrany *et al.*, 2006).

II.1.4.4. PROCESOS FINALES

El producto resultante de la fermentación principal es indudablemente cerveza, no obstante, contiene partículas en suspensión y, por consiguiente, está turbia, carece de suficiente carbonatación, el sabor no está del todo maduro, es inestable desde el punto de vista microbiológico y físico y puede requerir correcciones del color (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003). A continuación se describen los procesos requeridos para la obtención de cerveza con unas características organolépticas adecuadas.

II.1.4.4.1. Maduración o guarda

La maduración o guarda de la cerveza requiere la presencia de la levadura, que va a consumir los carbohidratos fermentables presentes en la cerveza verde (fermentación secundaria), se realiza a 0–2°C y dura una semana aproximadamente. Los objetivos principales de esta etapa son los siguientes (Castañé, 2000; Sanchís *et al.*, 2000):

1. Modificación del sabor de la cerveza. Después de la fermentación principal, la cerveza verde posee un fuerte sabor a levadura, es amarga y no tiene una gran aceptación. Por ello, es necesario que se modifiquen o desaparezcan algunos compuestos como diacetonas, aldehídos, ácidos grasos volátiles, aminoácidos, proteínas y compuestos de azufre. Además, esta maduración del sabor se considera generalmente la consecuencia más importante de la guarda y acabado de una cerveza debido a la tendencia actual de producir cervezas más ligeras.
2. Eliminación de las materias en suspensión mediante decantación (por ej.: levaduras muertas, complejos proteínas-taninos y materia amorfa).
3. Saturación de la cerveza con dióxido de carbono (carbonatación). Durante el almacenamiento convencional, la cerveza verde contiene un 1% de azúcares fermentables que se transforman en dióxido de carbono y etanol. No obstante, la presión que se aplica durante el almacenamiento a 0°C permite que el dióxido de carbono se disuelva en la cerveza y, por ello, al final de la maduración la cerveza contiene una concentración de dióxido de carbono de 4–4,8 g/l.

Por otra parte, en esta fase suelen añadirse a la cerveza verde diversos aditivos (sección II.1.3.6) destinados a: (i) normalizar sus características organolépticas, (ii) mejorar su capacidad espumante, (iii) estabilizarla, evitando el deterioro de su sabor y la formación de turbidez una vez envasada y/o (iv) ajustar su amargor mediante la adición de concentrados isomerizados de lúpulo (Hough, 1990; Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.4.4.2. Filtración y clarificación

El almacenamiento de la cerveza verde a bajas temperaturas produce una lenta sedimentación de partículas en suspensión y levaduras; sin embargo, para conseguir que todas las partículas y levaduras se depositen y que la cerveza se vuelva brillante se requeriría un periodo de almacenamiento muy prolongado. Por ello, el objetivo de la filtración es eliminar todos los microorganismos y partículas coloidales en suspensión presentes en la cerveza al final del almacenamiento, asegurándose una claridad estable en el producto final. Esta operación debe realizarse a bajas temperaturas (si es posible a –1°C), con una concentración de oxígeno disuelto inferior a 0,1 mg/l, y la calidad del producto filtrado debe ser óptima en relación al sabor, espuma, color y ausencia de microorganismos. Para la filtración se pueden utilizar: (i) filtros de tierras, en los que el material de filtración está constituido por tierras de diatomeas y, en menor medida, perlita y/o (ii) filtros de hojas, que se emplean cuando la cerveza está casi brillante y contiene pocas partículas en suspensión. Asimismo, durante la filtración pueden añadirse diversos aditivos tales como estabilizantes coloidales (por ej.: polivinilpirrolidona), estabilizantes de espuma (por ej.: alginatos) y antioxidantes (por ej.: ácidos ascórbico, cítrico y láctico) (sección II.1.3.6). Por otra parte, la centrifugación de la cerveza se utiliza cuando se emplean levaduras no floculantes o con bajo poder de floculación (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003).

II.1.4.4.3. Envasado y tratamiento higienizante

La cerveza suele envasarse en botella, lata o barril, empleando como materiales el vidrio y metal. El vidrio es inerte, no incorpora colores, olores ni sabores, es impermeable a los gases y resiste a los

tratamientos de limpieza e higiene, no obstante, protege muy poco de la luz. Los envases de metal protegen la cerveza de la luz pero pueden conferirle sabores procedentes de los lubricantes, recubrimientos y las cubiertas decorativas, así como del propio material metálico si no se toman las precauciones oportunas durante su fabricación. Por otra parte, la cerveza que va a envasarse debe ser transparente, estar fría (-1 ó -2°C) y presentar una correcta carbonatación, que se ha realizado mediante una fermentación secundaria y/o inyección de dióxido de carbono. Asimismo, en todo el proceso de envasado hay que minimizar al máximo el contacto con el oxígeno (Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003).

La pasteurización es el sistema más utilizado para conseguir la estabilización microbiológica de la cerveza. Su objetivo es reducir la posibilidad de que los microorganismos sobrevivan por encima de un nivel determinado, ya que la industria cervecera pretende que este proceso sea lo más breve posible, no obstante, este objetivo depende de muchos factores como son el tipo de cerveza, el número y tipo de microorganismos presentes, y el tamaño y tipo de envase. Este tratamiento suele realizarse en el envase final (envases pequeños), no obstante, también es posible pasteurizar la cerveza y realizar a continuación el envasado (barriles o envases grandes), pero este sistema, así como otros (filtración esterilizante en frío), requiere un envasado prácticamente aséptico y unos controles rigurosos de calidad que aseguren que la cerveza no se contamine. Una unidad de pasteurización (UP) se define como 1 min a 60°C y, en los envases pequeños, los cerveceros trabajan con un intervalo de 10–20 UP, así pues, la cerveza puede llegar a estar 40 min en el pasteurizador para que se alcance la temperatura requerida y se mantenga durante el tiempo necesario. Por otra parte, en los envases grandes se emplea la pasteurización “*flash*”, que consiste en pasar una fina corriente de cerveza por un intercambiador de placas durante un tiempo mínimo, para que la cerveza se mantenga a temperaturas de 70 – 72°C y obtener una pasteurización de 15–25 UP (Hough, 1990; Sanchís *et al.*, 2000; Bamforth, 2003).

II.1.5. TIPOS DE CERVEZA

A pesar de que en la producción cervecera se emplean ingredientes similares existen algunas cervezas en el mundo que merecen ser destacadas por su sabor y sus características especiales. Antiguamente, en Europa central y oriental cada cervecería desarrollaba su tipo único de cerveza que solía tomar el nombre de la ciudad de origen y algunas de estas cervezas se han erigido en referente para los especialistas y han sido “copiadas” frecuentemente, indicándose en la botella el nombre original. Así pues, la palabra “*pilsener*” indica que se ha copiado la forma de producción y las características de la cerveza producida originalmente en Pilsen (Eslovaquia). Como es lógico, la calidad del agua de estas ciudades y lugares de origen era de importancia capital para tener éxito al imitar las características de la cerveza deseada; no obstante, las técnicas actuales permiten que se reproduzca muy fielmente la calidad del agua de la ciudad de origen (Sanchís *et al.*, 2000).

Actualmente, aparte de la clasificación legal de las cervezas (sección II.1.1), existen otros criterios para establecer su clasificación (por ej.: origen y características organolépticas) siendo el más científico

el basado en el tipo de fermentación. Así pues, atendiendo al tipo de fermentación la cerveza puede clasificarse del siguiente modo (Tabla II.3) (Galán *et al.*, 2004; Estrany *et al.*, 2007):

1. Cervezas de fermentación “baja o *lager*”. Son cervezas, en general, claras (rubias), con matices dorados, intenso sabor a lúpulo y muy refrescantes. Suelen elaborarse con maltas claras (poco tostadas) y las levaduras actúan a temperaturas comprendidas entre 6 y 8°C y transcurridos 8–10 días se depositan en el fondo de la cuba de fermentación. Entre estas cervezas se encuentran las cervezas especiales.
2. Cervezas de fermentación “alta o *ale*”. Son cervezas, en general, de tonos oscuros, ya que se elaboran con maltas más oscuras. La levadura actúa a temperaturas comprendidas entre 14 y 20°C y transcurridos un máximo de 5 días ascienden a la parte superior de la cuba.
3. Cervezas de fermentación espontánea. Son cervezas de fermentación alta que se fabrican, fundamentalmente en Bélgica, con un 70% de malta y un 30% de trigo candéal. A los mostos no se les agrega levadura y la fermentación tiene lugar por exposición al aire y contaminación con los microorganismos presentes en la bodega, lo que confiere a estas cervezas unas características genuinas. En algunas ocasiones, se realiza una segunda fermentación, tras la adición de cerezas o frambuesas, que les confiere aromas y sabores especiales.

Tabla II.3. Principales cervezas elaboradas en Europa

Nombre	Tipo de fermentación	Características	Graduación alcohólica (% vol/vol)	Origen
Ambarinas	Alta	Color rojizo-ambarino y con sabor suave a levadura y especias	4,0–5,0	Alemania y Bélgica
Blancas	Alta	Turbias, elaboradas con malta de cebada y trigo y muy refrescantes	3,0–5,0	Alemania y Bélgica
Abadía	Alta	Su origen es una abadía y pueden ser oscuras (dobles) o pálidas (triples)	6,0–9,0	Bélgica
Lambic	Alta (espontánea)	Turbias, espuma estable y poco amargas	4,5–5,5	Bélgica
Gueuze	Alta (espontánea)	Mezcla de lambic vieja y nueva, refermentada en botella y suplementada con frutas	5,0	Bélgica
Trapenses	Alta	Elaboradas en 6 abadías cerveceras. Claras o negras, refermentadas y de sabor dulce-amargo ligeramente tostado	6,0–12,0	Bélgica
Ale	Alta	Color claro (ámbar). Varios tipos según amargor, color y dulzor	3,0–4,0	Gran Bretaña
Porter	Alta	Muy oscuras, casi negras, afrutadas, densas y muy nutritivas	5,0–7,0	Gran Bretaña
Stout	Alta	Color pardo oscuro o negro y muy lupuladas. Espuma muy compacta y cremosa	3,7–5,5	Gran Bretaña
Pilsener	Baja	Pálida, aroma fresco, sabor seco, muy lupulada y agua poco mineralizada	4,5–5,5	Republica Checa
Bock	Baja	Tonos dorados, marrones u oscuros	6,2	Alemania
Dortmunder	Baja	Pálida, menos amarga y sabor más intenso que la Pilsener	4,0–5,0	Alemania
Münchner	Baja	Color pardo, fuerte, densa y poco lupulada	5,0	Alemania
Rauchbier	Baja	Oscura, ya que se elabora con maltas ahumadas	5,0	Alemania
Viena	Baja	Color dorado oscuro y sabor ligeramente dulce	Variable	Austria

Adaptado de Sanchis et al. (2000) y Galán et al. (2004).

La cerveza “sin alcohol” (sección II.1.1) es un producto relativamente nuevo en el mercado que satisface las necesidades adicionales de determinados consumidores que desean disfrutar de una bebida refrescante como es la cerveza y que no quieren o no pueden consumir alcohol a las dosis habituales de la cerveza, y cuyo consumo ha aumentando en los últimos años, siendo la cuota de cerveza “sin alcohol” en España la más alta de la UE (sección II.1.2) (Martínez *et al.*, 2001; Anónimo, 2003). De forma general, este tipo de cerveza puede obtenerse mediante dos procedimientos (Hornsey, 1999; Bamforth, 2003):

1. Fermentación limitada o controlada, que, a su vez, puede realizarse: (i) deteniendo el crecimiento de las levaduras de una fermentación normal mediante enfriamiento rápido a 0°C, (ii) mediante maceración a alta temperatura, produciendo mostos modificados, (iii) empleando levaduras con capacidad limitada de fermentación, (iv) según el proceso “Barrell”, que implica la fermentación de dos lotes de mostos, uno normal y otro con menor cantidad de alcohol, y su mezcla posterior en proporciones predeterminadas para obtener productos con diferentes concentraciones de alcohol; (v) fermentación a temperaturas bajas durante 48 h y/o (vi) utilización del bagazo procedente de un macerado cervecero para la elaboración del mosto lupulado.
2. Técnicas de postfermentación, con el objeto de eliminar el alcohol de una cerveza elaborada normalmente. Las técnicas empleadas para ello son la destilación, evaporación, osmosis inversa y/o diálisis.

II.1.6. FACTORES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO EN LA CERVEZA

La cerveza es una bebida con una alta estabilidad microbiológica y, en principio, no constituye un medio adecuado para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos debido una serie de factores de estrés microbiano, entre los que se incluyen los siguientes (Jespersen y Jakobsen, 1996; Varnam y Sutherland, 1997; Sendra y Carbonell, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003):

1. Factores intrínsecos. Características naturales de la cerveza: (i) presencia de isohumulonas del lúpulo (17–55 mg de iso- α -ácidos/l); (ii) multiplicación masiva de la levadura seleccionada; (iii) bajo pH (3,8–4,7); (iv) presencia de anhídrido carbónico (aprox., 0,5%, m/vol); (v) baja concentración de oxígeno (< 0,1 ppm); (vi) presencia de etanol (1–10%, vol/vol); (vii) escasos nutrientes residuales, principalmente hidratos de carbono y proteínas, y (viii) presencia de ácidos orgánicos y acetaldehído y otros metabolitos antimicrobianos.
2. Factores extrínsecos. Características de las instalaciones y operaciones: (i) ebullición del mosto, (ii) enfriamiento del mosto en circuito cerrado y en mínimo tiempo, (iii) inoculación inmediata en el mosto de un cultivo masivo de levadura microbiológicamente pura, (iv) renovación regular de la levadura a partir de un cultivo puro del laboratorio, (v) filtración esterilizante excluyendo el oxígeno de los gases del proceso y trasiegos, (vi) filtración de la cerveza después de la maduración, (vii) envasado aséptico, (viii) pasteurización o filtración esterilizante, (ix) mantenimiento de unas

correctas prácticas de higiene y la asepsia, (x) refrigeración y (xi) utilización de conservantes químicos como el dióxido de azufre y sus sales (sulfitos) y el ácido benzoico y sus sales (benzoatos) (Tabla II.1).

De estos factores de estrés microbiano, las isohumulonas del lúpulo (principalmente los iso- α -ácidos) constituyen uno de los más importantes para impedir el crecimiento microbiano en la cerveza. Los iso- α -ácidos, derivados de las flores de la planta del lúpulo (sección II.1.3.3), confieren a la cerveza un sabor amargo y ejercen un efecto bactericida o bacteriostático frente a la mayoría de los microorganismos alterantes de la cerveza, ya que actúan como compuestos ionóforos (compuestos hidrofóbicos que se introducen en la membrana celular y aumentan la permeabilidad a ciertos iones) que disipan el gradiente de pH transmembrana (Simpson, 1993a, b; Sakamoto *et al.*, 2001; Sakamoto, 2002; Iijima *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006). Sin embargo, varias especies de bacterias lácticas, principalmente *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus* spp., son capaces de crecer y alterar la cerveza (sección II.1.7.1), ya que toleran los iso- α -ácidos del lúpulo (Simpson y Fernandez, 1992; Simpson, 1993b; Sakamoto *et al.*, 2001; Sakamoto, 2002; Iijima *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006).

La resistencia de las bacterias lácticas a estos compuestos antimicrobianos se ha estudiado durante los últimos años, observándose que se debe a la presencia de los genes *horA*, *horB* y/o *horC* (Sami *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2005a, b; Iijima *et al.*, 2007). Sami *et al.* (1998) aislaron de cerveza la cepa *Lactobacillus brevis* ABBC45 y demostraron que el gen *horA*, que se encontraba en el plásmido pRH45, confería a esta cepa resistencia al lúpulo, permitiéndola crecer y alterar la cerveza. A este respecto, *horA* codifica una proteína de membrana (HorA) perteneciente al sistema de transporte del tipo ABC (del inglés *ATP-Binding Cassette*) (sección II.5.1.1), cuya presencia en las bacterias lácticas les permite secretar al medio extracelular los iso- α -ácidos del lúpulo (van Veen *et al.*, 1996; Sami *et al.*, 1997a; Sakamoto *et al.*, 2001; Sakamoto, 2002). La secuenciación aminoacídica de HorA reveló que presentaba una similitud de un 53% con LmrA de *Lactococcus lactis*, otra proteína de membrana del sistema de transporte del tipo ABC (Fath y Kolter, 1993; van Veen *et al.*, 1996; Sami *et al.*, 1997a; Sakamoto *et al.*, 2001; Sakamoto, 2002). Además, Suzuki *et al.* (2005a) han aislado *horA* del plásmido pRH20690 en *Lactobacillus lindneri* DSM20690^T, y su secuencia aminoacídica mostró una similitud del 99,7% con *horA* de *Lb. brevis*. Esta similitud permite considerar que estas bacterias lácticas han adquirido este gen mediante transferencia horizontal de los respectivos plásmidos (Suzuki *et al.*, 2005a). Asimismo, se ha observado que muchas de estas bacterias lácticas aumentan gradualmente su resistencia al lúpulo si se cultivan en medios en los que se van incrementando gradualmente las concentraciones de iso- α -ácidos, denominándose a este fenómeno adaptación al lúpulo (Sami *et al.*, 1997a; Suzuki *et al.*, 2002, 2006). Por el contrario, si se cultivan estas bacterias lácticas en medios sin iso- α -ácidos pierden la capacidad de crecer y alterar la cerveza, debido a que pierden el plásmido que les confiere resistencia frente a estos compuestos (Sami *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2004, 2005b). Por otra parte, Suzuki *et al.* (2002) aislaron una variante de *Lb. brevis* ABBC45 que no poseía el plásmido pRH45 y la denominaron *Lb. brevis* ABBC45^C. Esta cepa mostraba escasa resistencia al lúpulo, que aumentaba cuando se cultivaba en un medio en el que se incrementaban las concentraciones de iso- α -

ácidos. No obstante, la resistencia al lúpulo de esta variante era siempre menor que la de la cepa original, lo que indicaba que *Lb. brevis* ABBC45^C poseía un mecanismo de resistencia al lúpulo independiente al conferido por la proteína transportadora HorA. En este contexto, se aisló un plásmido, denominado pRH45II, que contiene los genes *horB* y *horC*, que ejercen un papel importante en la resistencia al lúpulo de las bacterias lácticas (Suzuki *et al.*, 2004). Así pues, estos genes codifican las proteínas HorB y HorC que constituyen, respectivamente, un regulador de respuesta y una proteína de membrana perteneciente a la superfamilia RND (del inglés *Resistance-Nodulation-Cell Division*). El gen *horB* presenta homología con los reguladores pertenecientes a la familia AcrR, que regulan la transcripción de genes que codifican transportadores pertenecientes a la superfamilia RND (*horC*). Los análisis de HorC indicaron que posee varios dominios transmembrana (TMD, del inglés *Transmembrane Domains*) con un gran dominio hidrofílico entre TMD1 y TMD2, una característica típica de los transportadores pertenecientes a la superfamilia RND (Suzuki *et al.*, 2005b). Estas proteínas se han descrito en varias especies de bacterias lácticas como *Lactobacillus backi*, *Lb. brevis*, *Lb. lindneri*, *Lactobacillus paracollinoides*, *Pediococcus damnosus* y *Pediococcus inopinatus*, siendo su secuencia nucleotídica muy similar lo que determina que estos microorganismos han adquirido estos genes mediante transferencia horizontal de los respectivos plásmidos (Suzuki *et al.*, 2005b; Iijima *et al.*, 2007). Asimismo, las bacterias lácticas que contienen *horB* y *horC* en su genoma aumentan su resistencia al lúpulo al cultivarlas en un medio en el que se incrementan progresivamente las concentraciones de iso- α -ácidos (Iijima *et al.*, 2006); sin embargo, cuando se cultivan en medios sin iso- α -ácidos estas cepas pierden la capacidad de crecer y alterar la cerveza, ya que pierden el plásmido que les confiere resistencia frente a estos compuestos (Sami *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2004, 2005b). Además, la presencia de *horB* y *horC* en estas bacterias lácticas confiere un aumento de su resistencia a otros compuestos antimicrobianos como el bromuro de etidio y la nisina A (NisA) (Iijima *et al.*, 2006). Con base en lo anterior, *horA*, *horB* y *horC* pueden utilizarse como marcadores genéticos para determinar si una bacteria láctica posee o no capacidad para alterar la cerveza (Suzuki *et al.*, 2005b; Iijima *et al.*, 2007). Finalmente, conviene mencionar que diversos estudios demuestran que las bacterias lácticas también pueden resistir al lúpulo mediante otros mecanismos entre los que se incluyen: (i) la presencia de la proteína transportadora HitA, típica de lactobacilos alterantes de cerveza (Hayashi *et al.*, 2001); (ii) una alteración de la cantidad de ácidos lipoteicoicos presentes en la pared celular (Behr *et al.*, 2006) y/o (iii) modificaciones en la composición lipídica de la membrana citoplasmática (Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Behr *et al.*, 2006).

II.1.7. ALTERACIONES DE LA CERVEZA DURANTE SU ELABORACIÓN Y ALMACENAMIENTO

A pesar de los factores de estrés microbiano citados anteriormente (sección II.1.6), tanto durante la elaboración de la cerveza como en el producto final pueden producirse alteraciones debidas principalmente al crecimiento de microorganismos ajenos a los que participan en la fermentación, entre los que se incluyen diversas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y levaduras salvajes (Jespersen

y Jakobsen, 1996; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003). Además de los problemas microbiológicos que se describirán a continuación, en la cerveza pueden producirse las siguientes alteraciones:

1. Alteraciones no microbianas, entre las que se incluyen: (i) sabor y aroma a “insolado” o a “luz” y olor a mofeta, producido por la formación de preniltercaptano mediante la escisión de las cadenas laterales de las isohumulonas y su combinación con el dióxido de azufre; estas alteraciones se previenen protegiendo los envases de la luz (envases verdes o marrones opacos) o mediante un tratamiento con borohidruro; (ii) sabores y aromas indeseables, producidos por el desarrollo de carbonilos (por ej.: *trans*-2-nonanal) que poseen un umbral de detección muy bajo, se forman mediante un gran número de reacciones en las que el oxígeno tiene un papel clave y son un factor muy importante en el deterioro del sabor de la cerveza durante almacenamientos prolongados, especialmente en las cervezas tipo “lager” embotelladas, produciendo un sabor y aroma a “oxidado” y a “cartón”, que se incrementa por la exposición a altas temperaturas, a la luz y a los iones metálicos; asimismo, la formación excesiva de productos a partir de la reacción de Maillard también puede producir alteraciones del sabor y aroma (por ej.: a toffee, a azúcar quemado o caramelo y a “cartón”); (iii) turbidez, producida por la afinidad de las proantocianidinas de la cebada por las proteínas y que suele asociarse al desarrollo de sabores a “oxidado” en la cerveza ya elaborada, y (iv) pardeamiento, producido por cambios oxidativos de los polifenoles de la malta y el lúpulo, la reacción de Maillard y/o la caramelización de los azúcares durante la elaboración y almacenamiento de la cerveza, que se incrementa por las altas temperaturas de almacenamiento y la presencia de oxígeno y metales en las cervezas embotelladas; estas alteraciones pueden prevenirse mediante pH bajos (aprox., 4,2), condiciones anaeróbicas en las cervezas embotelladas y una baja temperatura durante su almacenamiento (Varnam y Sutherland, 1997; Anónimo, 2006d).
2. Contaminaciones abióticas, producidas por hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosaminas y micotoxinas. Las micotoxinas, compuestos fúngicos tóxicos producto del metabolismo secundario de los mohos, pueden producirse debido a la contaminación fúngica de los cereales durante su crecimiento, recolección o almacenamiento, sobre todo si la tasa de humedad supera el 12–13%. En maltería y cervecería existen una serie de procesos, como el remojo de la cebada, tostado, la extracción sólido/líquido de la producción del mosto, ebullición del mosto, filtración de la masa y fermentación, que pueden reducir los niveles de micotoxinas que se encuentran inicialmente en las materias primas. A pesar de ello, existen micotoxinas acumuladas en los granos de cebada y otros cereales que son incorporados como adjuntos al mosto y que pueden llegar a la cerveza, entre las que destacan las aflatoxinas, zearalenonas, ocratoxinas y fumonisinas. No obstante, la mayoría de los estudios realizados en cervezas comercializadas revelan que, en el caso de que estas micotoxinas se encuentren presentes en la cerveza, las concentraciones detectadas son muy inferiores a las requeridas para ejercer un efecto perjudicial para los consumidores (Sendra y Carbonell, 1999; Sanchís *et al.*, 2000).

La mayoría de las alteraciones de la cerveza se deben a problemas microbiológicos. A este respecto, los microorganismos abundan en el aire y en las materias primas de todos los procesos

industriales de fabricación de alimentos y bebidas. En el caso de la maltería y cervecería, el agua, la malta, los cereales, los azúcares y el lúpulo constituyen las fuentes potenciales de microorganismos, no obstante, conviene destacar que hasta la fecha no se ha descrito el crecimiento de microorganismos patógenos en la cerveza. El agua que se utiliza en cervecería debe ser potable y, por consiguiente, contendrá niveles bajos de microorganismos y ninguno será peligroso para el ser humano. Por otra parte, las materias primas que son sometidas a temperaturas altas y ebullición (por ej.: malta, cereales, azúcares y lúpulo) pueden representar un peligro sólo durante su almacenamiento previo al tratamiento; por ello, deben almacenarse alejadas de los lugares en los que se manipula la levadura y en los que tiene lugar la fermentación y ebullición del mosto. En España, debido a la sequedad habitual del clima, las alteraciones microbiológicas de la cebada y la malta constituyen un hecho excepcional, sin embargo, en Europa del norte los microorganismos de la cebada y la malta producen una serie de efectos en cervecería, entre los que se destacan la reducción de la estabilidad del gas o “gushing”. Por otra parte, conviene destacar que la levadura que se reutiliza para sembrar el mosto es el principal vehículo y origen de los microorganismos alterantes, pudiendo controlarse mediante el empleo de soluciones ácidas (por ej.: ácido fosfórico diluido y/o persulfato amónico acidificado) o de la bacteriocina NisA (Ogden *et al.*, 1988; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2005). Así pues, los microorganismos de importancia para las cervecerías son los que pueden entrar en contacto con el mosto al enfriarse y con la cerveza durante su proceso de fabricación o durante el envasado, ya que pueden permanecer en las superficies internas y externas del equipamiento de la planta. A este respecto, el mosto es un sustrato muy rico desde el punto de vista nutritivo, presenta un pH de 5,5 y contiene oxígeno y un gran número de microorganismos con la capacidad de desarrollarse (Jespersen y Jakobsen, 1996; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003).

A continuación, se describen los principales problemas microbiológicos que se producen durante la elaboración y el almacenamiento de la cerveza.

II.1.7.1. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

Las bacterias lácticas son las principales bacterias Gram-positivas alterantes de la cerveza y representan en la actualidad un grave problema para la moderna industria cervecera, tanto por sus importantes repercusiones económicas, que pueden ser suficientemente graves como para amenazar la continuidad de las compañías cerveceras, especialmente de las más pequeñas, como por el detrimento que provocan en la calidad higiénico-sanitaria del producto final. En las alteraciones microbianas de la cerveza se encuentran implicados principalmente microorganismos de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, que son responsables de aproximadamente el 70% de los casos (Back, 1994; Jespersen y Jakobsen, 1996; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; March *et al.*, 2005). En este contexto, durante el periodo 1980–1990, el 58–88% de los casos de alteración microbiana de la cerveza registrados en Alemania fueron debidos al desarrollo de lactobacilos y pediococos (Back *et al.*, 1988; Back, 1994); además, todas las bacterias aisladas de cerveza alterada elaboradas en la República Checa pertenecían al grupo de las bacterias lácticas (Hollerová y Kubizninková, 2001).

II.1.7.1.1. Género *Lactobacillus*

Los microorganismos de este género son ácido-tolerantes, anaerobios estrictos o microaerófilos y, según su metabolismo fermentativo, pueden clasificarse en especies homofermentativas (el producto final mayoritario de su metabolismo es ácido láctico) y heterofermentativas (los productos finales de su metabolismo son ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono y etanol). Los lactobacilos pueden utilizar para su crecimiento carbohidratos residuales (por ej.: glucosa, fructosa, maltosa y ribosa), nitrógeno y vitaminas de la cerveza. El crecimiento de estos microorganismos, especialmente de los lactobacilos heterofermentativos, ocasiona una serie de alteraciones en la cerveza como la acidificación (sabor a ácido láctico), turbidez (hebras sedosas) y, principalmente, producción de diacetilo (que confiere un sabor a mantequilla indeseable en cervezas ligeras, aunque deseable en cervezas tipo “ale”) debido a que su umbral de detección es muy bajo y se pueden producir alteraciones en la cerveza sin que aparezcan signos visibles de turbidez. Además, estas especies contaminan frecuentemente los inóculos de levadura y sólo pueden crecer durante la fermentación debido a que la deficiencia de aminoácidos en la cerveza ya elaborada actúa como factor limitante. El número de especies de este género con capacidad de alterar esta bebida está muy limitado y éstas varían en su habilidad para crecer en las diferentes cervezas y en su tolerancia a los compuestos amargos procedentes del lúpulo. Las principales especies alterantes de la cerveza son las siguientes: (i) *Lb. brevis*, la especie alterante de la cerveza más común, tolerante al lúpulo, que crece óptimamente a 30°C y pH 4–6 y que puede producir alteraciones organolépticas de este producto debido a su habilidad para fermentar las dextrinas y el almidón del mosto y (ii) *Lb. lindneri*, insensible a los iso- α -ácidos del lúpulo, termotolerante y que crece óptimamente a 19–23°C; todas las cepas de esta especie pueden alterar la cerveza y *Lb. lindneri* fue responsable del 15–25% de los casos de alteración microbiana de la cerveza producidos en Alemania durante el periodo 1980–1990. Asimismo, existen otras especies que pueden alterar la cerveza, entre las que destacan: (i) *Lactobacillus buchnerii*, que necesita riboflavina para poder desarrollarse y posee la capacidad de fermentar la melicitosa, (ii) *Lactobacillus casei*, que puede producir concentraciones elevadas de diacetilo, y (iii) *Lactobacillus brevisimilis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryneformis*, *Lactobacillus malefermentans*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus plantarum*, que también se han aislado de cervezas alteradas (Rinck y Wackerbauer, 1987; Back, 1994; Fernandez y Simpson, 1995; Jespersen y Jakobsen, 1996; Varnam y Sutherland, 1997; Storgards *et al.*, 1998; Hornsey, 1999; Castañé, 2000; Sanchís *et al.*, 2000; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2004, 2005).

II.1.7.1.2. Género *Pediococcus*

Los pediococos aparecen en grupos de dos a cuatro células (tétradas) y, originalmente, estos microorganismos se conocían como “*sarcinae*” debido a que su morfología celular se confundía con las agrupaciones cúbicas de ocho células de las verdaderas sarcinas. Su temperatura óptima de crecimiento es 25°C y requieren vitaminas para crecer o estimular su crecimiento. Estos microorganismos son un contaminante común de la cerveza que se aísla al final de la fermentación y durante su almacenamiento, predominando en cervezas fermentadas a bajas temperaturas y, por ello, están

involucrados frecuentemente en las alteraciones de las cervezas tipo “lager”. La especie que se aísla más frecuentemente es *P. damnosus* y, con menor frecuencia, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus dextrinicus*, *P. inopinatus*, *Pediococcus parvulus* y *Pediococcus pentosaceus*. No obstante, sólo *P. damnosus* y, en menor medida, *P. inopinatus* y *P. dextrinicus* (en cervezas con un pH superior a 4,2 y con pequeñas concentraciones de iso- α -ácidos y etanol) pueden crecer en la cerveza, aunque las otras especies pueden sobrevivir en este producto durante largos periodos de tiempo. Asimismo, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* pueden aislarse y desarrollarse durante las fases iniciales de la maceración. Estas especies de pediococos producen una pérdida de calidad de la cerveza a causa de la denominada “enfermedad sarcina”, caracterizada por un exceso de acidez, turbidez sedosa, sedimento granular, filamentosidad y aparición de sabores y aromas anómalos debido a la producción de diacetilo y 2,3-butanodiol. Conviene destacar que estas alteraciones sólo se producen cuando el crecimiento de los pediococos es elevado y, por ello, la alteración más importante que causan estos microorganismos está relacionada con la producción de diacetilo. Además, estas especies pueden provocar un aumento del tiempo de fermentación y la disminución de la cantidad de levadura en suspensión. Finalmente, estos microorganismos son contaminantes de la levadura y presentan una gran resistencia a los productos de limpieza que se utilizan normalmente en las cervecerías y, por ello, son capaces de colonizar los equipos de producción que, a su vez, actuarán posteriormente como focos de infección (Jespersen y Jakobsen, 1996; Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005).

II.1.7.1.3. Otras bacterias Gram-positivas

Además de las especies de los géneros citados anteriormente, *Lactobacillus* y *Pediococcus*, pueden aislarse de la cerveza especies pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*. No obstante, estos microorganismos no se consideran alterantes comunes de la cerveza y no suelen crecer en ella aunque pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo. *Micrococcus kristinae* es el alterante más importante de estos géneros y constituye una especie atípica ya que puede crecer en cervezas con pequeñas concentraciones de etanol y lúpulo y con valores de pH superiores a 4,5, incorporando a la cerveza un aroma afrutado y un sabor atípico (Jespersen y Jakobsen, 1996; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005).

II.1.7.2. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

En este grupo microbiano se incluyen, principalmente, los siguientes tipos de bacterias detectados en cervecería: microorganismos de los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera* y *Zymomonas*, bacterias acéticas y enterobacterias. En los últimos años, las nuevas tecnologías cerveceras que excluyen de forma muy estricta el oxígeno durante gran parte del proceso de elaboración de la cerveza han provocado un aumento en el número de incidentes causados por microorganismos anaeróbicos estrictos pertenecientes a los géneros *Pectinatus* y *Megasphaera* y en los que la levadura de siembra actúa como una fuente continua de infección (Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 1999).

II.1.7.2.1. Género *Pectinatus*

Los microorganismos de este género son bacilos no esporulados y anaerobios estrictos que se presentan de forma aislada, en pareja y raramente en pequeñas cadenas. Existen dos especies que pueden causar alteración de la cerveza *Pectinatus cerevisiiphilus* y *Pectinatus frisingensis*, cuyo crecimiento se produce a 15–40°C (óptimo a 32°C), pH de 3,5–6 (óptimo de 4,5) y una concentración de etanol máxima del 4,5% (vol/vol). Estas bacterias producen grandes cantidades de ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y, en menor medida, ácido láctico. Asimismo, liberan cantidades considerables de sulfuro de hidrógeno, que en combinación con los ácidos grasos volátiles y no volátiles produce un olor nauseabundo (a huevos podridos) y la cerveza se vuelve turbia aproximadamente a los cinco días. No obstante, estos microorganismos son sensibles a tratamientos térmicos superiores a 58°C y, afortunadamente, sólo afectan a cervezas no sometidas a pasteurización (Jespersen y Jakobsen, 1996; Satokari *et al.*, 1997, 1998; Chihib *et al.*, 1999; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005). A este respecto, estas bacterias fueron responsables del 20–30% de los casos de alteración microbiana de cervezas no pasteurizadas producidas en Alemania durante el periodo 1980–1990 (Back *et al.*, 1988; Back, 1994).

II.1.7.2.2. Género *Megasphaera*

En este género se incluyen microorganismos de morfología cocoide, no esporulados y anaerobios estrictos que se presentan en parejas y, ocasionalmente, en pequeñas cadenas. La única especie con capacidad para alterar la cerveza es *Megasphaera cerevisiae*, cuyo crecimiento se produce a 15–37°C (óptimo a 28°C), es sensible al etanol (> 2,8%, vol/vol) y a pH bajos (< 4,1). Este microorganismo posee la capacidad de alterar la cerveza ya elaborada mediante la producción de turbidez sedosa y olores desagradables (olor fecal) debido a la secreción de cantidades considerables de ácido butírico y, en menor cantidad, ácido caproico, ácido valérico, ácido isovalérico y acetoina (Jespersen y Jakobsen, 1996; Satokari *et al.*, 1998; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005). En este sentido, estas bacterias fueron responsables del 3–7% de los casos de alteración microbiana de cervezas producidas en Alemania durante el periodo 1980–1990 (Back *et al.*, 1988; Back, 1994).

II.1.7.2.3. Otras bacterias Gram-negativas

Los microorganismos del género *Zymomonas* son bacilos cortos y gruesos, relacionados genética, fenotípica y ecológicamente con las bacterias acéticas, se presentan de forma aislada o en parejas, son anaerobios, aunque toleran bajas concentraciones de oxígeno, y toleran pH bajos (> 3,4) y altas concentraciones de etanol (8–10%, vol/vol) e iso- α -ácidos. De las tres subespecies de *Zymomonas mobilis* descritas, la única que puede causar alteración en la cerveza es *Zymomonas mobilis* subesp. *mobilis*, que suele ser un contaminante de cervezas con “*priming*” (cervezas que se les añade glucosa en el producto final) y provoca la alteración más grave, pero poco frecuente, de las cervezas tipo “*ale*”. La alteración que produce en la cerveza se caracteriza por una turbidez densa y un olor desagradable debido a la producción de sulfuro de hidrógeno, acetaldehído y pequeñas cantidades de dimetilsulfuro

y dimetil disulfuro. La presencia de este microorganismo está asociada con fallos en la limpieza de los barriles de cervezas tipo “ale” y, de forma general, no se aísla de la levadura de siembra. Conviene destacar que esta alteración no se ha descrito nunca en cervezas tipo “lager” ya que las bajas temperaturas de las fermentaciones correspondientes no son favorables para el crecimiento de *Z. mobilis* (Jespersen y Jakobsen, 1996; Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005).

Las bacterias acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteriaceae* y comprenden dos géneros principales *Acetobacter* y *Gluconobacter*. El género más importante en cervecería es *Acetobacter* y las especies *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti*. Estos microorganismos son aerobios obligados, se presentan aislados, en parejas o cadenas y su crecimiento en la cerveza se caracteriza por la formación de películas o cubiertas de tipo grasiento, turbidez, acetificación (agriado) y, en algunas ocasiones, depósitos y viscosidad a causa de la formación de dextranos y levanos. Estos microorganismos sobreviven a la fermentación y pueden aislarse del inóculo de levadura, no obstante, las fuentes normales de contaminación son los equipos de almacenamiento, filtración y llenado de la cerveza. A pesar de ello, las bacterias acéticas no son consideradas un gran problema para las cervecías ya que son aerobios obligados (Jespersen y Jakobsen, 1996; Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005).

Las enterobacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y son anaerobios facultativos (crecen en presencia y ausencia de oxígeno). Estas bacterias no toleran el etanol y no pueden crecer en un medio con pH inferior a 4,3 y, por ello, no pueden causar alteraciones en la cerveza terminada. Sin embargo, estos microorganismos pueden ser potentes alterantes del mosto, si se almacenan durante largos periodos de tiempo antes de inocular la levadura, ya que crecen rápidamente y producen dimetilsulfuro, compuestos fenólicos y diacetilo. Asimismo, pueden aparecer en las primeras etapas de la fermentación produciendo sabores y olores extraños (afrutado) e inhibición del crecimiento de la levadura cervecera. Las especies más importantes son *Obesumbacterium proteus*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella* spp. en las que la principal fuente de contaminación son la cebada, malta, el agua y lúpulo. Algunas de estas especies pueden reducir el nitrato a nitrito, lo que constituye una posible causa del incremento de los niveles de nitrosaminas en la cerveza. (Jespersen y Jakobsen, 1996; Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Mauguieret y Walker, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005; Koivula *et al.*, 2006).

Además de las especies citadas anteriormente, pueden aislarse de la cerveza otras bacterias Gram-negativas, entre las que destacan: (i) *Selenomonas lacticifex*, microorganismo anaerobio estricto que se aísla de la levadura de siembra, (ii) microorganismos de los géneros *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas*, de metabolismo estrictamente respiratorio que se aíslan del mosto, no obstante, no se conocen alteraciones del proceso o del producto provocadas por estos microorganismos y (iii) *Zymophilus raffinivorans* y *Zymophilus paucivorans*, aunque sólo la primera especie es alterante de cervezas con un pH superior a 4,3 y una concentración de etanol inferior a 5% (vol/vol)

(Jespersen y Jakobsen, 1996; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005).

II.1.7.3. ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LEVADURAS SALVAJES

Las levaduras que no siendo cepas de la levadura cervecera o de siembra se encuentran o se aíslan en el proceso de cervecería, principalmente durante la fermentación y en la cerveza terminada, se denominan levaduras salvajes. También se han definido como las levaduras que no se emplean deliberadamente en el proceso y cuyo desarrollo no está completamente controlado. Estas levaduras constituyen un peligro para la industria cervecera debido a su dificultad para detectarlas y, a diferencia de las bacterias, su resistencia a los lavados sucesivos de la levadura de siembra con soluciones ácidas. Conviene destacar que en cervecería los pasos o etapas previas a la ebullición del mosto son considerados de poca importancia como fuente de levaduras salvajes debido a que ninguna de ellas son lo suficientemente termorresistentes para sobrevivir a una ebullición (Varnam y Sutherland, 1997; Sanchís *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2005).

Las levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora* y *Zigosaccharomyces* son similares desde el punto de vista bioquímico y, por ello, capaces potencialmente de competir con las cepas cerveceras de *Saccharomyces* spp. A excepción de las levaduras “asesinas” (del inglés *killer*), las levaduras contaminantes tienen un bajo o nulo efecto frente a las levaduras cerveceras, aunque algunas de ellas son capaces de crecer a un ritmo ligeramente superior a éstas y pueden aumentar significativamente su concentración en la levadura de siembra tras sucesivas reutilizaciones. Sin embargo, las levaduras “asesinas” son capaces de matar a las levaduras cerveceras sensibles, llegando a ser dominantes en la fermentación por sustitución de la levadura cervecera y provocando sabores extraños, turbidez, exceso de gas, etc. (Sanchís *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2005).

La floculación (habilidad de las levaduras para adherirse en flóculos y sedimentar rápidamente en el medio en que estén suspendidas) es una propiedad importante de las levaduras cerveceras. Muchas levaduras salvajes no floculan y permanecen en la cerveza, aún después de haber floculado la levadura cervecera, provocando turbidez además de sabores extraños y no deseables. Asimismo, *Sc. cerevisiae* puede causar alteración durante una fermentación tipo “lager” y *Sc. pastorianus* durante una fermentación tipo “ale”. Además de estas alteraciones, los efectos alterantes de las principales levaduras salvajes encontradas en cervecería son los siguientes (Jespersen y Jakobsen, 1996; Hornsey, 1999; Sanchís *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2005):

1. Géneros *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Kloeckera* y *Candida*. Producen fermentaciones no esperadas, turbidez y sabores extraños.
2. Géneros *Dekkera* y *Brettanomyces*. Producen ácido acético y turbidez. Son levaduras fermentativas que requieren oxígeno para crecer y cuya presencia en las cervezas tipo “lambic” es primordial.
3. Géneros *Debaryomyces*, *Pichia* y *Candida*. Producen turbidez y sabor a levadura o a éster y, a menudo, forman una película o “biofilm” que se fragmenta produciendo escamas o sedimentos. Estas levaduras crecen en la cerveza únicamente bajo condiciones aeróbicas y la especie *Pichia membranaefaciens* es la levadura alterante no fermentativa más frecuente en cervecería.

En general, la contaminación por levaduras salvajes tiene su origen en la levadura de siembra, superficies del equipo (por ej.: tuberías y paredes de los tanques), aire y agua. Para evitar esta contaminación, la planta de procesamiento debe presentar superficies internas lisas y las partes del equipo que están en contacto con la cerveza deben limpiarse con soluciones ácidas y esterilizarse inmediatamente después de cada fermentación. No obstante, en las industrias cerveceras, de forma preventiva, se reemplaza rutinariamente la levadura de siembra después de un número determinado o prefijado de fermentaciones sucesivas (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.8. CONTROL DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN CERVECERÍA

El control de la calidad microbiológica en una cervecería se lleva a cabo mediante el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) y su objetivo es garantizar la estabilidad organoléptica de la cerveza ya que en esta bebida, en principio, no se encuentran microorganismos patógenos. A este respecto, el control y la garantía de la calidad en las cervecerías afecta a cuatro aspectos principales: (i) la idoneidad de la limpieza de la planta, que debe realizarse después de cada ciclo de producción, (ii) la aceptabilidad de las materias primas, mediante la realización de análisis de laboratorio, (iii) el estado del mosto y de la cerveza durante su producción, mediante la realización de análisis químicos y microbiológicos, y (iv) las propiedades de la cerveza final, mediante la realización de análisis químicos, microbiológicos y sensoriales para comprobar que la cerveza cumple las especificaciones marcadas. Por otra parte, según el manual “*Methods of Analysis*” del “*Institute of Brewing*” del Reino Unido (Anónimo, 1997), los principales puntos críticos de control en el proceso de fabricación de la cerveza son el tratamiento del agua, la propagación de la levadura previa a ser inoculada en el fermentador, la fermentación, la manipulación de la levadura reutilizada y los procesos de filtración, esterilización y pasteurización. Según este manual, las fases de producción del mosto no se consideran peligrosas desde el punto de vista microbiológico, así pues, al mosto hervido se le considera libre de microorganismos peligrosos para la cerveza y los pocos que hayan podido sobrevivir a la ebullición no pueden crecer bien en el producto en proceso o terminado. Así pues, se considera que los microorganismos alterantes pueden proceder de las superficies de los equipos o materias que después de la ebullición entran en contacto con el mosto, la levadura y cerveza a lo largo del proceso (Anónimo, 1997).

Conviene destacar que la industria cervecera utiliza el dióxido de azufre y sus sales (sulfitos) como conservantes químicos y antioxidantes a una dosis máxima de 10–12 ppm debido a que la dosis máxima residual de estos compuestos no puede superar los valores de la Tabla II.1, no obstante, se tiene constancia desde hace tiempo de que su presencia en la cerveza puede originar en algunos consumidores reacciones adversas como choque anafiláctico, reacciones asmáticas, urticaria, náuseas, dolores abdominales y diarrea (Gall *et al.*, 1996). Por otra parte, mediante el lavado ácido de la levadura y/o el empleo de NisA pueden eliminarse algunas de las bacterias alterantes de la cerveza, y la pasteurización o filtración permite reducir o eliminar los microorganismos no deseados. Por ello, los medios principales para evitar la proliferación de microorganismos son las medidas preventivas que se incluyen dentro de las buenas prácticas de fabricación, complementadas con un adecuado diseño y las

correctas medidas higiénicas de las instalaciones. A pesar de todo, es imposible trabajar en condiciones estériles en un entorno industrial y, por ello, la determinación de la carga microbiológica durante el proceso de elaboración de la cerveza sirve para averiguar si las medidas preventivas están cumpliendo el objetivo de eliminar o reducir los riesgos microbiológicos a niveles aceptables (Sanchís *et al.*, 2000). De forma general, para determinar esta carga microbiológica pueden emplearse métodos microbiológicos y métodos genéticos e inmunoquímicos.

II.1.8.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Los análisis microbiológicos que se emplean para la detección de los microorganismos alterantes de la cerveza se basan en la siembra de las muestras, obtenidas durante el proceso de elaboración de la cerveza, en un medio nutritivo y su incubación en unas condiciones definidas de tiempo, temperatura, etc. Actualmente, no existe ningún método capaz de detectar todos los microorganismos alterantes en un solo análisis y, además, el desarrollo de microorganismos en un medio de cultivo no implica que éstos sean alterantes. Por ello, se requiere el aislamiento e identificación de los diferentes microorganismos mediante pruebas bioquímicas, fisiológicas y morfológicas (Sanchís *et al.*, 2000; Thelen *et al.*, 2004).

Los medios de cultivo más sencillos empleados para la determinación de microorganismos alterantes de la cerveza se basan en los productos del proceso como el mosto a un pH 5,5 y/o la cerveza (con el etanol añadido después de la esterilización) a un pH 4,3 aproximadamente. Los microorganismos aislados de productos de cervecería deberían desarrollarse en estas condiciones, no obstante, estos medios son variables en calidad y su preparación es muy costosa. Por ello, la industria cervecera utiliza medios de cultivo comercializados debido a que su calidad es mucho más constante, están optimizados y, además, existen numerosos medios que permiten el desarrollo de los diferentes microorganismos alterantes de la cerveza (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.8.1.1. Medios de cultivo para la detección de bacterias lácticas

Actualmente, en la industria cervecera se emplean numerosos medios para la detección de *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus* spp., entre los que destacan los siguientes: (i) MRS (del inglés *De Man, Rogosa y Sharpe*) suplementado con maltosa o cerveza; (ii) NBB (del alemán *Nährboden für Bierschädlingen Bakterien*) que permite el desarrollo rápido de lactobacilos y pediococos, no obstante, también permite el desarrollo de bacterias de los géneros *Pectinatus* y *Megasphaera* y (iii) Raka Ray N°3. Asimismo, existen otros medios de menor interés para la detección de bacterias lácticas como el UBA (del inglés *Universal Beer Agar*), el HLP (del inglés *Hsu's Lactobacillus and Pediococcus medium*) y el VLB S7-S (del alemán *Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei*). De forma general, estos medios de cultivo se suplementan con ciclohexamida (*Actidione*®), para inhibir el desarrollo de levaduras y mohos, y/o 2-feniletanol, para inhibir el desarrollo de bacterias Gram-negativas. Conviene destacar que ninguno de estos medios permite el desarrollo de todas las cepas de lactobacilos y pediococos, no obstante, su combinación permite la detección de la mayoría de las bacterias lácticas alterantes de la cerveza (Jespersen y Jakobsen, 1996; Sanchís *et al.*, 2000; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; Suzuki *et al.*, 2008).

II.1.8.1.2. Medios de cultivo para la detección de *Pectinatus* spp. y *Megasphaera* spp.

El medio específico que se emplea en la industria cervecera para la detección de bacterias pertenecientes a los géneros *Pectinatus* y *Megasphaera* es el SMMP (del inglés *Selective Medium for Megasphaera and Pectinatus*), que está compuesto por cerveza y suplementado con un 1,0% (m/vol) de extracto de levadura, lactato y peptona, agentes reductores, 20 ppm de ciclohexamida, 25 ppm de violeta de cristal y 5 ppm de fusidato de sodio para inhibir el desarrollo de las bacterias Gram positivas. La pérdida de especificidad de este medio, debida a la posible evaporación del etanol de la cerveza, puede prevenirse mediante la adición periódica de este compuesto al medio. Además, existen otros medios menos selectivos para la detección de estas bacterias como: (i) MRS concentrado, (ii) cerveza suplementada con peptona, extracto de levadura, fructosa y tioglicato, (iii) el LL-Agar y (iv) el UBA, NBB y Raka-Ray N°3 empleados para análisis rutinarios en las cervecerías (Jespersen y Jakobsen, 1996; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003).

II.1.8.1.3. Medios de cultivo para la detección de otras bacterias

Para la detección de *Zymomonas* spp. la industria cervecera emplea el medio sólido MYGP, que está compuesto por extracto de malta y levadura, glucosa y peptona (se ajusta el pH a 4,0 con ácido láctico), suplementado con 20 ppm de ciclohexamida y 3% de etanol (vol/vol). Además, puede utilizarse un medio líquido compuesto por glucosa, fructosa y extracto de levadura (se ajusta el pH a 4,0 con ácido láctico), suplementado con 100 ppm de ciclohexamida (Anónimo, 1981; Jespersen y Jakobsen, 1996).

Por otra parte, para la detección de bacterias acéticas se utilizan los medios sólidos, suplementados con ciclohexamida (20 ppm), GYECC (del inglés *Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate*), WLN (del inglés *Wallerstein Laboratory Nutrient*) y WLN suplementado con 2% de etanol (vol/vol). El medio WLN posee verde de bromobenceno (22 mg/l) lo que permite la identificación de estas bacterias por su coloración verde (Bartowsky *et al.*, 2003). Asimismo, para la detección de enterobacterias el manual “*The European Brewing Convention*” recomienda utilizar el medio MacConkey-Agar suplementado con 10 ppm de ciclohexamida (Anónimo, 1981; Jespersen y Jakobsen, 1996).

II.1.8.1.4. Medios de cultivo para la detección de levaduras salvajes

Actualmente, la industria cervecera posee diversos medios de cultivo para detectar la presencia de levaduras salvajes, no obstante, ninguno de estos medios permite la detección de todas ellas. El medio WLN es uno de los más utilizados para detectar estas levaduras debido a que permite su desarrollo, aunque debe suplementarse con un bactericida (por ej.: tetraciclina o cloranfenicol) que inhiba totalmente el crecimiento bacteriano. Por otra parte, para la diferenciación entre *Saccharomyces* spp. de las especies no *Saccharomyces* spp. puede emplearse un medio de cultivo específico que posee lisina como única fuente de nitrógeno, ya que no permite el desarrollo de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*. Asimismo, para detectar la presencia de levaduras “ale” en una fermentación “lager” puede utilizarse el medio sólido MYGP a 37°C debido a que en estas condiciones sólo pueden desarrollarse levaduras “ale” y algunas levaduras salvajes. Por el contrario, la utilización de un medio

de cultivo específico que posee melibiosa como única fuente de carbono permite la detección de levaduras “lager” en una fermentación “ale”. Por último, otros medios de menor interés para la detección de levaduras salvajes son el WA (del inglés *Wort-Agar*) suplementado con violeta de cristal, el SDM (del inglés *Schwarz Differential Medium*) y el LWYM (del inglés *Lin's Wild Yeast Medium*) (Jespersen y Jakobsen, 1996; Hornsey, 1999).

Conviene destacar que la utilización de estos medios de cultivo requiere largos periodos de incubación para obtener los resultados. No obstante, existen métodos microbiológicos más rápidos para la detección de levaduras contaminantes, entre los que destaca el que se emplea para detectar cepas salvajes de *Saccharomyces* spp. que producen malos sabores y olores fenólicos. La producción de estos compuestos está regulada por un gen único *POFI*, presente en las cepas salvajes de *Saccharomyces* spp. aisladas de cervecería. La incubación de estas levaduras en mosto lupulado estéril suplementado con ácido ferúlico permite la liberación de un aroma similar a un clavo (Hornsey, 1999). Por otra parte, el análisis de esporulación es un método tradicional empleado para la detección de levaduras salvajes, en el que la muestra de levadura se encuentra en un papel de filtro húmedo y se expone directamente a acetato de potasio o sodio, o se crece en un medio que le contiene, lo que induce la formación de esporas en la levadura que pueden observarse al microscopio. De forma general, las levaduras cerveceras no producen esporas o las producen en menor número que las levaduras salvajes (Jørgensen, 1948; Jespersen y Jakobsen, 1996).

II.1.8.2. MÉTODOS GENÉTICOS E INMUNOQUÍMICOS

Las técnicas microbiológicas descritas permiten la detección de números muy bajos de microorganismos en un producto cervecero, sin embargo, como se mencionó anteriormente, los resultados se obtienen después de varios días de incubación (3–6 días) y, por ello, la investigación de métodos más rápidos es un objetivo prioritario de las industrias cerveceras (Yasui y Yoda, 1997b; Satokari *et al.*, 1998; Mauguieret y Walker, 2002; March *et al.*, 2005; Koivula *et al.*, 2006).

De forma general, una técnica de detección debería poseer las siguientes características: (i) rapidez en la obtención del resultado, (ii) bajo umbral de detección, (iii) elevada selectividad, (iv) posibilidad de distinguir entre células viables e inviables, (v) bajo coste, (vi) elevada capacidad de procesamiento de muestras por persona y día y/o (vii) aplicabilidad tanto a cerveza filtrada como sin filtrar. A pesar de que ninguna técnica analítica cumple todos estos requisitos, las técnicas que se emplean en cervecería pueden clasificarse en tres grupos con base en: (i) la detección directa de los microorganismos, (ii) la detección indirecta de sus subproductos o de la modificación del medio debido a su actividad y/o (iii) la detección de alguno de sus componentes celulares (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.8.2.1. Técnicas basadas en la detección directa de los microorganismos

Algunos colorantes fluorescentes poseen la capacidad de unirse selectivamente a los microorganismos vivos y, por ello, se han desarrollado diversas técnicas para la detección de los microorganismos alterantes de la cerveza, entre las que destacan las siguientes (Yasui y Yoda, 1997b; Sanchís *et al.*, 2000; Thelen *et al.*, 2004; March *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2006):

1. Técnica de epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT, del inglés *Direct Epifluorescent Filter Technique*), que no puede aplicarse a cerveza sin filtrar y posee pocas aplicaciones en los análisis rutinarios ya que no permite distinguir entre células viables e inviables.
2. Técnica de fluorescencia de microcolonias sobre filtros de membrana (MMCF, del inglés *Membrane Filter Microcolony Fluorescence Method*), que permite diferenciar entre células viables e inviables, no obstante, el protocolo es muy laborioso y requiere 24–48 h de incubación.

II.1.8.2.2. Técnicas basadas en la detección de subproductos o de modificaciones en el medio debidas a la actividad de los microorganismos

Entre estas técnicas se encuentran la medida de la conductancia/impedancia y la medida del pH, que se caracterizan por su menor sensibilidad y por necesitar un tiempo mayor para la obtención de resultados que las otras técnicas citadas debido a que los microorganismos deben alcanzar la fase logarítmica para producir cantidades de subproducto detectables o variaciones medibles en el medio. A este respecto, el análisis de subproductos metabólicos por cromatografía de gases se ha aplicado a los pediococos que producen diacetilo y a las bacterias Gram-negativas que producen dimetilsulfuro (Sanchís *et al.*, 2000).

II.1.8.2.3. Técnicas basadas en la detección de determinados componentes celulares

II.1.8.2.3.1. Técnicas inmunoquímicas

La posibilidad de producir anticuerpos policlonales o monoclonales específicos frente a los microorganismos alterantes de la cerveza presenta un gran potencial ya que permite la detección e identificación de los microorganismos en un único análisis. Además, esta técnica puede combinarse con el empleo de la fluorescencia, observación microscópica previa concentración de la muestra, citometría de flujo o los biosensores en FIA (del inglés *Flow Injection Analysis*). Los principales inconvenientes de esta técnica son que no permite diferenciar entre microorganismos viables e inviables y que, ocasionalmente, pueden producirse falsos positivos y negativos (Sanchís *et al.*, 2000). No obstante, en la actualidad existen diversos anticuerpos monoclonales específicos frente a bacterias lácticas alterantes de la cerveza (Yasui *et al.*, 1992, 1995; Yasui y Yoda, 1997a, b; Tsuchiya *et al.*, 2000; Nakakita *et al.*, 2002; March *et al.*, 2005).

II.1.8.2.3.2. Técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos

Estas técnicas se basan, principalmente, en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) que permite amplificar específicamente pequeñas cantidades de ADN *in vitro* mediante la utilización de una enzima ADN polimerasa que es estable a altas temperaturas. El empleo de esta técnica permite detectar una sola célula presente en la muestra, además de detectar e identificar bacterias y levaduras alterantes de cerveza. Para ello, se utilizan oligonucleótidos (cebadores) específicos para cada microorganismo alterante, que se obtienen de sus secuencias de ARN específicas ya que el ARN está presente en mayor cantidad que las secuencias génicas correspondientes, y permite detectar la presencia de organismos viables. Esta técnica presenta las ventajas de su gran especificidad y sensibilidad, y los inconvenientes de que debe conocerse las

secuencias del ADN específicas de cada grupo de microorganismos de interés en cervcería, diseñarse los cebadores adecuados, comprobarse que no reaccionan frente a otros microorganismos presentes en las muestras reales y, además, si se detecta ADN no puede distinguirse entre microorganismos viables e inviables (Sanchís *et al.*, 2000). Actualmente, existen cebadores específicos frente a: (i) las fracciones 5S y 16S del ARNr de bacterias lácticas alterantes de la cerveza (DiMichele y Lewis, 1993; Tsuchiya *et al.*, 1994; Taguchi *et al.*, 1995; Tompkins *et al.*, 1996; Sami *et al.*, 1997b; Yasui *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 2005); (ii) la fracción 16S del ADNr de bacterias pertenecientes a los géneros *Pectinatus* y *Megasphaera* (Satokari *et al.*, 1997, 1998); (iii) la fracción 16S del ADNr y ARNr de *O. proteus* (Maugueret y Walker, 2002; Koivula *et al.*, 2006) y (iv) los genes que confieren resistencia al lúpulo de las bacterias lácticas alterantes de la cerveza (*horA*, *horB*, *horC* y ORF5) (Sami *et al.*, 1997b; Suzuki *et al.*, 2005b, 2006)

II.1.8.2.3.3. Técnica basada en la bioluminometría

Esta técnica se basa en que todos los microorganismos vivos contienen ATP, molécula responsable de transportar y almacenar la energía en los seres vivos. Este compuesto puede obtenerse mediante un reactivo específico y a través de un complejo enzimático de luciferín-luciferasa de luciérnaga se cataliza una reacción de bioluminiscencia en la que a partir de ATP y en presencia de oxígeno se obtiene luz que se detecta en un espectrofotómetro. La luz es proporcional a la cantidad de ATP presente en los microorganismos y los resultados se obtienen de forma instantánea. El umbral de detección de este método es inferior al de otras técnicas, sin embargo, presenta los inconvenientes de que no permite distinguir el tipo de microorganismo (alterante o no) y sólo puede utilizarse para cervezas filtradas. Así pues, esta técnica debe combinarse necesariamente con un paso previo de filtración e incubación de la muestra a analizar (Sanchís *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000; Nakakita *et al.*, 2002).

Debido a las alteraciones de la cerveza durante su elaboración y almacenamiento (sección II.1.7), resulta de gran interés la investigación de nuevas metodologías que permitan minimizar el riesgo de alteración microbiana de la cerveza. En este contexto, dado que la seguridad e inocuidad de las bacterias lácticas asociadas a los alimentos se ha aceptado durante mucho tiempo, se ha sugerido su empleo y/o el de sus metabolitos como bioconservantes, para que, formando parte de un sistema de “barreras” u “obstáculos” (Cleveland *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006), permitan garantizar la seguridad y la calidad higiénica, y prolongar la vida útil de los alimentos que se consumen (Horn *et al.*, 1998; Cleveland *et al.*, 2001; Vaughan *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas (péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal que se sintetizan con o sin modificaciones postraduccionales) son las más interesantes tecnológicamente debido a su posible utilización como bioconservantes alimentarios para inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos, y que permitirían obtener productos más naturales, más saludables y con menos aditivos químicos (Nes *et al.*, 1996; Cintas y Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; O’Sullivan *et al.*, 2002a; Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006).

II.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL: BACTERIOCINAS

II.2.1. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE SÍNTESIS RIBOSOMAL

Los péptidos con actividad antimicrobiana se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo producidos por una gran variedad de organismos, entre los que se incluyen animales vertebrados e invertebrados (mamíferos, aves, anfibios, peces, crustáceos e insectos), plantas y microorganismos (bacterias, hongos y estreptomicetos), en los que constituyen la primera línea de defensa natural y forman parte de su inmunidad innata (Hancock *et al.*, 1995; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Hancock y Chapple, 1999; Dutton *et al.*, 2002; Diep y Nes, 2002; Papagianni, 2003). Entre las propiedades que los convierten en péptidos antimicrobianos defensivos efectivos destacan: (i) su toxicidad selectiva, es decir, capacidad de distinción entre células productoras y células diana, (ii) su acción antibiótica rápida, (iii) su espectro antibacteriano amplio y (iv) su baja inducción de aparición de resistencias microbianas (Matsuzaki, 1999). Hasta la fecha, se han descrito y caracterizado una gran variedad de péptidos antimicrobianos que, según su mecanismo de biosíntesis, se clasifican en dos grandes grupos: (i) péptidos de síntesis no ribosomal, entre los que se incluyen diversos antibióticos (por ej.: polimixinas, bacitracinas y glicopéptidos) producidos por bacterias, hongos y estreptomicetos y (ii) péptidos de síntesis ribosomal, producidos por multitud de especies animales, vegetales y bacterianas (denominados, en este último caso, bacteriocinas) (Hancock *et al.*, 1995; Epan y Vogel, 1999; Hancock y Chapple, 1999; Dutton *et al.*, 2002; Lüders *et al.*, 2003). La mayoría de los péptidos antimicrobianos de organismos eucariotas superiores son producidos por las mucosas y superficies corporales y, en el caso de los anfibios, se sintetizan en glándulas especiales (Zasloff, 1987; Kreil, 1994). En los mamíferos, estos péptidos se encuentran en los gránulos de los fagocitos (Lehrer *et al.*, 1993; Boman, 1995), mientras que en los insectos están localizados en la hemolinfa (Boman, 1995).

De forma general, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal muestran una escasa homología en su estructura primaria, sin embargo, tienen en común su pequeño tamaño molecular (aprox., 20–60 aa) y su naturaleza catiónica y anfipática (presencia de regiones hidrofóbicas e hidrofílicas), responsable de su capacidad de interaccionar con las membranas citoplasmáticas de las células sensibles provocando su permeabilización/desestabilización (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Matsuzaki, 1999; Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003).

Aunque tradicionalmente se ha considerado que la acción letal de los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal se basa en la desestabilización de las membranas y su consiguiente despolarización, lo que conduce en última instancia a la muerte celular (Cleveland *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002), se han descrito péptidos capaces de atravesar las membranas intactas e interaccionar con las dianas intracelulares (Nissen-Meyer y Nes 1997; Hancock y Rozek, 2002). A este respecto, se ha sugerido la existencia de diversas dianas potenciales en los microorganismos sensibles, tales como la membrana, la división celular, la síntesis de proteínas, ADN o ARN y la activación autolítica, y que cada uno de los péptidos antimicrobianos “selecciona” una o varias de ellas (Hancock y Rozek, 2002).

Por otra parte, los péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal producidos por células eucariotas y células procariotas (bacterianas) se diferencian en su actividad, espectro de acción y potencia. En primer lugar, la actividad de los péptidos antimicrobianos eucarióticos se dirige a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (actividad antimicrobiana) y, también, a células eucariotas (actividad quimiotáctica y proinflamatoria), mientras que, de forma general, los péptidos antimicrobianos bacterianos únicamente tienen una actividad antimicrobiana y un espectro de acción reducido, dirigiéndose principalmente a especies y géneros relacionados. En segundo lugar, los péptidos antimicrobianos bacterianos son activos a concentraciones del orden pico-nanomolar, por lo que su potencia es superior a la de los péptidos antimicrobianos eucarióticos, ya que éstos son activos a concentraciones del orden micromolar (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Diep y Nes, 2002; Dutton *et al.*, 2002).

La rápida emergencia de poblaciones bacterianas resistentes a numerosos antibióticos en especies con un elevado potencial patogénico ha incrementado el interés por el desarrollo de nuevos compuestos que proporcionen una protección más eficaz frente a las toxiinfecciones bacterianas y que puedan ser empleados en la industria alimentaria y farmacéutica (Bechinger, 1999; Epan y Vogel, 1999; Lohner y Prenner, 1999; Moll *et al.*, 1999b; Pag y Sahl, 2002b; Twomey *et al.*, 2002). Entre estos compuestos se encuentran los péptidos antimicrobianos naturales de síntesis ribosomal, particularmente los que ejercen actividad inmunológica, antitumoral, antifúngica y/o antivírica sin resultar hemolíticos ni citotóxicos para las células sanas de vertebrados (Bechinger, 1999). Aunque los péptidos antimicrobianos producidos por microorganismos eucariotas y procariotas se sintetizan y actúan en circunstancias muy diferentes, estos sistemas de defensa natural poseen elementos comunes a nivel molecular, por lo que la caracterización de los péptidos antimicrobianos eucarióticos puede resultar muy relevante en el estudio de los procarióticos, y viceversa, ya que permitiría optimizar su empleo independiente o conjuntamente en la industria alimentaria y farmacéutica (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Diep y Nes, 2002).

II.2.2. BACTERIOCINAS

II.2.2.1. DEFINICIÓN

El concepto de bacteriocina ha evolucionado paulatinamente desde que, durante la primera mitad del siglo XX, diversos investigadores describieron la asociación entre la actividad antimicrobiana de ciertos microorganismos y la producción de sustancias antimicrobianas y se propusiera el término “bacteriocina” para englobar las diferentes sustancias antimicrobianas de origen bacteriano del tipo de las colicinas, caracterizadas por: (i) su adsorción a receptores de membrana específicos, (ii) su actividad intraespecífica restringida a especies filogenéticamente próximas, (iii) su biosíntesis letal, (iv) su naturaleza proteica, (v) su modo de acción bactericida y (vi) la localización plasmídica de los determinantes genéticos que codifican su producción e inmunidad (Jacob *et al.*, 1953). Posteriormente, a la vista de las diferentes características de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, Tagg *et al.* (1976) las definieron como “sustancias antimicrobianas de naturaleza

peptídica y activas frente a bacterias con una estrecha relación filogenética con la especie productora”. Esta definición es válida únicamente para algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, ya que algunas poseen actividad bactericida frente a microorganismos alejados taxonómicamente de las especies que las producen, por lo que Konisky (1982) propuso una definición más general, definiéndolas como “agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora”. En los últimos años, se ha producido un extraordinario avance en la investigación sobre las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas y, principalmente, de las bacterias lácticas, lo que ha permitido elucidar su estructura, sus características físico-químicas, su modo de acción, la localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, procesamiento, transporte y regulación. Como consecuencia de todo ello, se han propuesto nuevas definiciones. Así pues, Klaenhammer (1988) las definió como “un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza proteica que varían en su espectro antimicrobiano, modo de acción, tamaño molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas”. Por otra parte, Jack *et al.* (1995) las definieron como “un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas bacterianas de síntesis ribosomal que se secretan al medio extracelular, con o sin modificaciones postraduccionales, y que poseen un espectro de acción antimicrobiano que puede ser reducido y limitado, al menos, a algunas cepas de su misma especie”. Por último, Stiles (1996) definió a las bacteriocinas como “sustancias cuyas únicas características comunes son su carácter proteico y su actividad antimicrobiana”.

En definitiva, las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) (Joerger *et al.*, 2000; O’Keeffe y Hill, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Hill y O’Keeffe, 2003; Gálvez *et al.*, 2007).

II.2.2.2. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS vs. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS GRAM-POSITIVAS

La capacidad de producir bacteriocinas (bacteriocinogenicidad) es un rasgo fenotípico muy extendido entre las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, no obstante, las bacteriocinas producidas por ambos grupos de microorganismos poseen características diferentes, destacando las diferencias en su tamaño molecular, estructura, espectro y modo de acción, organización genética y mecanismos de secreción, inmunidad y regulación (Tabla II.4).

II.2.2.2.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas (Tabla II.4) constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que varían en su tamaño molecular, dianas microbianas, modo de acción y mecanismos de inmunidad (Riley y Wertz, 2002). Dentro de este grupo heterogéneo, las bacteriocinas producidas por la familia *Enterobacteriaceae* son las mejor caracterizadas y se han clasificado en dos grupos principales: (i) grupo de las colicinas, que constituye el prototipo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y (ii) grupo de las microcinas (Pons *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Por otra parte, las piocinas constituyen otro grupo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005).

Tabla II.4. Características principales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas y Gram-positivas

	Gram-negativas^a	Gram-positivas
Tamaño molecular	Generalmente grande (proteínas) Variable según modo de acción (5–80 kDa)	Generalmente pequeñas (péptidos) Variable (2–35 kDa)
Espectro de actividad	Estrecho, generalmente reducido a especies estrechamente relacionadas filogenéticamente	Generalmente restringido a bacterias Gram-positivas Variable: reducido (por ej.: lactococcinas A, B y M) o amplio (por ej.: nisina, enterocina L50 y pediocina PA-1)
Producción	Letal para la célula productora Regulada por genes de regulación de la célula productora (inducida por condiciones que inducen la respuesta SOS)	No letal para la célula productora Ocasionalmente regulada por sistemas de regulación específicos para cada bacteriocina Principalmente entre la fase exponencial de crecimiento y la fase estacionaria
Organización genética	Gen estructural Gen de inmunidad Gen de lisis celular	Gen(es) estructural(es) Gen(es) de modificaciones postraduccionales Gen de procesamiento Gen(es) de secreción Gen(es) de inmunidad Genes de regulación
Localización de los genes	Generalmente en plásmidos	Plásmidos, cromosoma y transposones
Transporte	Generalmente a través de la lisis celular Ocasionalmente a través de transportadores del tipo ABC (del inglés <i>ATP-Binding Cassette</i>)	Generalmente a través de transportadores del tipo ABC Ocasionalmente mediante el sistema Sec
Presencia de dominios	Dominio N-terminal: translocación Dominio central: unión al receptor Dominio C-terminal: lisis e inmunidad	Dominio N-terminal: unión a la membrana Dominio C-terminal: inserción en la membrana
Modo de acción	Formación de poros en las membranas celulares Actividad nucleasa frente a ADN, ARNr y ARNt	Generalmente a través de la formación de poros en las membranas celulares
Clasificación	Colicinas (25–80 kDa): subgrupo de colicinas formadoras de poros y colicinas con actividad nucleasa Microcinas (<10 kDa): clases I (<5 kDa) y II (7–10 kDa) Piocinas: tipos R, F y S Bacteriocinas activas frente a patógenos de las plantas: caratovoricina, serracina P y glicinicina	Clase I (lantibióticos) (<5 kDa): subclases A y B Clase II (no lantibióticos) (< 10 kDa): subclases IIa, IIb y IIc Clase III (>30 kDa)

^aLas características se refieren principalmente al grupo de las colicinas (prototipo de bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas). Adaptado de Criado (2006).

Finalmente, existe un grupo de bacteriocinas, que no están totalmente caracterizadas, entre las que se encuentran la caratovoricina, serracina P y glicinicina A producidas por *Erwinia carotovora* subesp. *carotovora*, *Serratia phymithicum* y *Xanthomonas campestris*, respectivamente, que son activas frente a patógenos de las plantas, y que se encuentran en plásmidos y cromosomas (Fett y Maher, 1985; Heu *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 2001; Jabrane *et al.*, 2002; Holtsmark *et al.*, 2008).

Las colicinas son bacteriocinas producidas por *Escherichia coli* caracterizadas por: (i) su tamaño molecular relativamente grande (25–80 kDa); (ii) su producción mediada por condiciones de estrés (por ej.: niveles reducidos de oxígeno y nutrientes) que inducen la respuesta SOS; (iii) su síntesis generalmente letal para la célula productora; (iv) su interacción con las células diana a través de receptores específicos de la superficie celular, lo que determina la especificidad en el reconocimiento de la célula diana; (v) su estructura en dominios con un dominio N-terminal (implicado en la translocación de la bacteriocina al interior de la célula diana), un dominio central (implicado en la interacción con el receptor) y un dominio C-terminal (implicado en la lisis celular y la inmunidad); (vi)

la localización plasmídica de las agrupaciones génicas que codifican su producción y (vii) son activas frente a cepas de *E. coli* y *Salmonella* (Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Gillor *et al.*, 2005). A este respecto, los genes necesarios para la producción de las colicinas son: (i) gen estructural, que codifica la bacteriocina, (ii) gen de la inmunidad, que codifica una proteína que confiere inmunidad a la célula productora mediante su unión a la colicina y la posterior inactivación de ésta y (iii) gen de lisis, que codifica una proteína implicada en la liberación de la colicina mediante la lisis de la célula productora. Según su modo de acción, las colicinas se agrupan en dos subgrupos: (i) subgrupo de colicinas con actividad formadora de poros en la membrana celular, cuyo tamaño molecular varía entre 449 y 629 aminoácidos, y (ii) subgrupo de colicinas con actividad nucleasa sobre moléculas de ADN, ARNr y ARNt, que incluye colicinas cuyo tamaño molecular varía entre 178 y 777 aminoácidos (Joerger *et al.*, 2000; Riley y Wertz, 2002; Papagianni, 2003; Gillor *et al.*, 2005).

Asimismo, las microcinas son bacteriocinas producidas por *E. coli* (excepto una producida por *Klebsiella pneumoniae*) y caracterizadas por: (i) su tamaño molecular relativamente pequeño (<10 kDa); (ii) su producción no inducida por el sistema SOS; (iii) su síntesis no letal para la célula productora; (iv) su secreción generalmente durante la fase de crecimiento exponencial; (v) su modo de acción mediante la formación de poros en la membrana celular o mediante desestabilización del potencial de membrana y (vi) espectro de acción, frente a enterobacterias, más amplio que las colicinas. Además, conviene destacar que las microcinas comparten generalmente ciertas propiedades (termoestabilidad, resistencia a algunas proteasas, hidrofobicidad y resistencia a valores de pH extremos) con las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas (secciones II.2.2.2.2 y II.3.4) (Pons *et al.*, 2002; Papagianni, 2003; Gillor *et al.*, 2005; Duquesne *et al.*, 2007a, b). Por otra parte, las microcinas se agrupan en dos clases (I y II) según la presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente. La clase I (microcinas B17, C7, J25 y D93) agrupa las microcinas de tamaño molecular <5 kDa, con modificaciones postraduccionales en su secuencia y que ejercen su actividad antimicrobiana sobre dianas intracelulares (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2002). Por el contrario, la clase II (microcinas E492, L, V, H47 y 24) agrupa las microcinas de mayor tamaño molecular (7–10 kDa), sin modificaciones postraduccionales y cuya diana celular puede ser la membrana celular. Además, las microcinas de esta clase comparten muchas propiedades con las bacteriocinas de la clase IIa producidas por las bacterias lácticas (sección II.3.4.2), entre las que destacan: (i) su pequeño tamaño molecular; (ii) su termorresistencia; (iii) su hidrofobicidad; (iv) su síntesis como precursores inactivos (preprobacteriocina); (v) la presencia de extensiones N-terminales del tipo secuencia líder; (vi) su secreción mediante transportadores del tipo ABC; (vii) la ausencia de modificaciones postraduccionales y (viii) su actividad a nivel de membrana (Pons *et al.*, 2002).

Por otra parte, las piocinas son bacteriocinas producidas por *Pseudomona aeruginosa* caracterizadas por: (i) las agrupaciones génicas que codifican su producción se encuentran en el cromosoma y están constituidos por gen estructural, gen de inmunidad y en algunos casos gen de lisis; (ii) su expresión está inducida por agentes mutagénicos (por ej.: radiación ultravioleta, mitomicina C) que inducen la respuesta SOS y (iii) su espectro de acción es limitado frente a cepas de *Ps. aeruginosa* u otras bacterias Gram-negativas (por ej.: *Neisseria* y *Haemophilus*) (Duport *et al.*, 1995; Michel-

Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005). Según su estructura, las piocinas se agrupan en tres tipos (R, F y S): (i) las piocinas tipo R son cilindros huecos que actúan desestabilizando el potencial de membrana de la célula sensible (Kageyama, 1964); (ii) las piocinas tipo F son cañas no contráctiles con una estructura cuadrada en un extremo y una estructura fibrilar en el otro extremo (Kuroda y Kagiya, 1983) y (iii) las piocinas tipo S son más pequeñas (similares a las colicinas), solubles, sensibles a las proteasas y cuyo modo de acción es mediante la formación de poros o con actividad nucleasa frente a ADN y ARN (Duport *et al.*, 1995; Parret y de Mot, 2000).

II.2.2.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas son tan abundantes como las producidas por bacterias Gram-negativas, pero constituyen un grupo mucho más heterogéneo (Riley y Wertz, 2002). Las características diferenciales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas (Tabla II.4) son que: (i) su síntesis no es letal para la célula productora, ya que el transporte esta mediado generalmente por sistemas de transporte específicos y, ocasionalmente, por el sistema Sec (también denominado Ruta General de Secreción); (ii) su síntesis está mediada generalmente por sistemas de regulación específicos para cada bacteriocina; (iii) su producción está asociada generalmente al final de la fase exponencial de crecimiento y el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento y (iv) su espectro de acción antimicrobiana es variable, pero generalmente está restringido a otras bacterias Gram-positivas (Riley y Wertz, 2002). De forma general, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas se han agrupado en tres clases principales: (i) clase I (lantibióticos), en la que se incluyen las subclases Ia (lantibióticos elongados, flexibles y catiónicos) y Ib (lantibióticos globulares, aniónicos o neutros e hidrofóbicos); (ii) clase II (no lantibióticos), en la que se incluyen las subclases IIa (tipo pediocina), IIb (sistemas de dos péptidos), IIc (sin secuencia líder), IId (estructura cíclica) y IIE (otros) y (iii) clase III (Nes *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Nes *et al.*, 2007). El heterogéneo grupo de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, compuesto por diversas bacteriocinas adscritas a alguna de las tres clases descritas, constituye el prototipo de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas y sus características principales se describen en la sección II.3.4.

II.2.2.3. BACTERIOCINAS vs. ANTIBIÓTICOS

Tanto las bacteriocinas como los antibióticos son compuestos antimicrobianos capaces de controlar el crecimiento de determinados microorganismos, no obstante, ambos compuestos presentan diferencias en su composición, síntesis, espectro antimicrobiano, modo de acción, mecanismos de inmunidad y/o resistencia y toxicidad (Tabla II.5). Además, resulta importante diferenciar ambos grupos de compuestos, debido al potencial de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas como bioconservantes alimentarios (secciones II.2.2.4.1 y II.3.4.10) y a que, en la mayoría de los países, se lleva a cabo un exhaustivo control de la presencia de antibióticos en los alimentos.

Tabla II.5. Diferencias principales entre las bacteriocinas y los antibióticos

	Bacteriocinas	Antibióticos
Composición	Proteica	Variable, en ocasiones proteica
Síntesis	Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
	Ribosomal, generalmente como precursores inactivos	No ribosomal (complejos multi-enzimáticos)
Espectro de actividad antimicrobiana	Variable	Variable
	Generalmente espectro reducido (especies relacionadas filogenéticamente)	Afectan a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y a células eucariotas
Modo de acción	Generalmente mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática	Inhiben diversas funciones celulares (por ej.: síntesis de la pared bacteriana, proteínas, ADN y ARN)
	En ocasiones, inhiben la biosíntesis de la pared bacteriana	
Requerimientos para la interacción con la célula diana	En ocasiones, receptores específicos o moléculas “ <i>docking</i> ” (que facilitan su interacción con las dianas celulares de las células sensibles)	Receptores específicos
Inmunidad de la célula productora	Codificada por los genes de inmunidad	No descrita
Resistencia/Tolerancia	Generalmente por modificaciones en la composición de la membrana	Genes de resistencia específicos y transferibles, transportadores de resistencia a múltiples fármacos, mutaciones en las dianas celulares
Toxicidad/Efectos colaterales	No descritos	Descritos
Aplicación	Alimentos ^a y clínica	Clínica

^aLa aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios únicamente se ha propuesto para el grupo de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, habiéndose autorizado internacionalmente solamente la nisina y la pediocina como aditivo e ingrediente alimentario, respectivamente. *Adaptado de Cleveland et al. (2001) y Nes et al. (2002).*

Entre las principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos se incluyen las siguientes (Cleveland *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005):

1. Las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosomal (sección II.3.4.2); mientras que los antibióticos (de naturaleza peptídica o no) son sintetizados únicamente mediante complejos multienzimáticos.
2. Las bacteriocinas son generalmente metabolitos primarios (productos del metabolismo bacteriano generados durante la fase exponencial de crecimiento), cuya producción está regulada frecuentemente por un sistema de regulación de tres componentes (sección II.3.4.7.4); mientras que los antibióticos son metabolitos secundarios (productos del metabolismo bacteriano generados durante la fase estacionaria de crecimiento).
3. El espectro de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas es generalmente reducido, dirigiéndose principalmente a bacterias estrechamente relacionadas filogenéticamente con el microorganismo productor, exceptuando las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas con un espectro de acción amplio (sección II.3.4.3); mientras que los antibióticos tienen un espectro de actividad mucho más amplio.
4. Cada bacteriocina tiene su propia proteína de inmunidad, cuyo gen está ligado genéticamente al gen estructural de la bacteriocina (sección II.3.4.7.2); mientras que los determinantes genéticos que codifican la resistencia a antibióticos no están ligados a los genes que codifican la maquinaria para la síntesis de los antibióticos y, además, se expresan independientemente.

II.2.2.4. APLICACIONES DE LAS BACTERIOCINAS

A continuación, se describen brevemente diversas aplicaciones propuestas para diversas bacteriocinas. No obstante, el empleo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en la bioconservación de alimentos, por su gran potencial de aplicación en la industria alimentaria, se trata más detalladamente en la sección II.3.4.10.

II.2.2.4.1. Industria alimentaria

Hasta la fecha, se han propuesto múltiples aplicaciones de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas en los alimentos (Hugas, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Ryan *et al.*, 2002; Chen y Hoover, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Guinane *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Drider *et al.*, 2006; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006) derivadas de su eficacia para inhibir el desarrollo y/o eliminar la presencia de un gran número de microorganismos, principalmente bacterias patógenas y alterantes presentes en los alimentos (O'Sullivan *et al.*, 2002a; Työppönen *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006). De todas estas aplicaciones, destaca su empleo en la bioconservación de alimentos (sección II.3.4.10) para: (i) mejorar la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos y extender su vida útil, gracias a la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos (por ej.: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) y/o alterantes presentes en diversos alimentos (por ej.: quesos, embutidos, yogur, sopa, vegetales y bebidas) (McAuliffe *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006) y (ii) mejorar la calidad y características organolépticas de diversos alimentos (por ej.: quesos y vinos), gracias al control de la flora láctica que no forma parte del cultivo iniciador (flora NSLAB, del inglés *Non-Starter Lactic Acid Bacteria*) (Ryan *et al.*, 1996, 2001; Deegan *et al.*, 2006). Por otra parte, conviene destacar el potencial de aplicación de diversas bacteriocinas (por ej.: lactococcinas A, B y M [LciA, LciB y LciM], lacticina 3147 [Ltn3147], lacticina 481 [Ltn481] y enterocina AS-48 [EntAS-48]), sin efecto bioconservante, en la mejora de las características organolépticas de los quesos, gracias a la lisis de las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores, que provoca la liberación de sus enzimas intracelulares y, por lo tanto, la aceleración de su maduración (Ross *et al.*, 1999; Martínez-Cuesta *et al.*, 2001; Oumer *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002b; Peláez y Requena, 2005).

II.2.2.4.2. Otras aplicaciones

Debido al incremento de la aparición de resistencias a tratamientos antimicrobianos, la industria farmacéutica busca alternativas al empleo de antibióticos en el tratamiento de infecciones humanas y animales. En este sentido, las bacteriocinas podrían constituir una alternativa eficaz, por lo que se han desarrollado numerosos estudios para evaluar el potencial de diversas bacteriocinas como agentes terapéuticos en medicina humana y/o animal y se ha sugerido/propuesto su empleo en diversas aplicaciones (Ryan *et al.*, 2002; Joerger, 2003; Cotter *et al.*, 2005a, b; Gillor *et al.*, 2005; Guinane *et al.*, 2005; Nes *et al.*, 2007; Gillor y Ghazaryan, 2007):

1. Tratamiento de la úlcera péptica causada por *Helicobacter pylori*. Dado que NisA, producida por *Lc. lactis* (Kaletta y Entian, 1989), es efectiva *in vitro* frente a *H. pylori*, se ha propuesto su empleo

para el tratamiento de esta enfermedad, ya que, además, es insensible a la pepsina gástrica (pero no a las proteasas pancreáticas) y, en general, su actividad antimicrobiana está favorecida a pH ácido (característico del estómago). Por otra parte, NisA es activa frente a *Clostridium difficile*, causante de enterocolitis asociada a un tratamiento con antibióticos, ya que inhibe la germinación de sus esporas (Kim *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005a).

2. Tratamiento y prevención de la mastitis bovina causada por *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. A pesar de la baja solubilidad de NisA a pH fisiológico, en la actualidad es el ingrediente activo de dos productos (*Consept*[®] [solución] y *Wipe-Out*[®] [toallita]) comercializados para el tratamiento de la mastitis (Ryan *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1999; Cotter *et al.*, 2005a; Diez-Gonzalez, 2007). Por otra parte, dado que Ltn3147, producida por *Lc. lactis* (Ryan *et al.*, 1996), inhibe a todos los microorganismos Gram-positivos productores de mastitis evaluados hasta la fecha, se ha investigado su empleo en el tratamiento y/o la prevención de mastitis como una alternativa a los tratamientos antibióticos intramamarios, habiéndose demostrado que una formulación que contiene Ltn3147 en un “sello” mamario (*Teat Seal*[™]) protege eficazmente a los animales frente a *Streptococcus dysgalactiae* y *S. aureus* sin provocar irritación (Ryan *et al.*, 1998, 1999; Twomey *et al.*, 2000; Crispie *et al.*, 2005; Diez-Gonzalez, 2007). Asimismo, se ha sugerido que las bacteriocinas producidas por cepas de *Staphylococcus* spp. coagulasa-negativas (CNS, del inglés *Coagulase Negative Staphylococci*) y activas frente a otras cepas estafilocócicas productoras de mastitis podrían ser útiles, en forma purificada, para el tratamiento y/o la prevención de la mastitis causada por *Streptococcus* spp. (dos Santos-Nascimento *et al.*, 2005, 2006; Varella-Coelho *et al.*, 2007).
3. Tratamiento de las infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos. Se ha demostrado que las cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina (MRSA, del inglés *Methillicin Resistant Staphylococcus aureus*) y de *Enterococcus faecalis* resistentes a la vancomicina (VRE, del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*) son sensibles a Ltn3147, mersacidina y actagardina, producidas por *Lc. lactis*, *Bacillus subtilis* y *Actinoplanes* spp., respectivamente, por lo que estos lantibióticos tienen potencial para prevenir/tratar los casos de infecciones animales en los que el tratamiento antibiótico es indeseado o inefectivo (Guder *et al.*, 2000; Ryan *et al.*, 2002).
4. Tratamiento del acné causado por *Propionibacterium acnes*. Los lantibióticos Ltn3147, epidermina y gallidermina, producidos por *Lc. lactis*, *S. aureus* y *Staphylococcus gallinarum*, respectivamente, son efectivos frente a *Pr. acnes* y, además, son activos a pH fisiológico, por lo que podrían utilizarse en formulaciones tópicas para el tratamiento del acné (Ross *et al.*, 1999; Pag y Sahl, 2002a, b; Guinane *et al.*, 2005).
5. Prevención de la enfermedad periodontal y tratamiento/prevención de la caries dental causada por *Streptococcus mutans*. Diversos lantibióticos (por ej.: NisA y mutacinas) incorporados en colutorios bucales pueden ser útiles para prevenir la enfermedad periodontal (Howell, 1993; Ryan *et al.*, 2002; Islam *et al.*, 2007). Por otra parte, Ltn3147 es activa frente a *St. mutans*, por lo que su incorporación en pastas dentales y colutorios bucales podría resultar eficaz para la prevención de la caries dental (Guinane *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, 2006).

6. Prevención de la faringitis producida por *Streptococcus pyogenes*, que causa mal aliento. Algunas cepas del género *Streptococcus* productoras de lantibióticos efectivos frente a *St. pyogenes* (por ej.: cepas de *St. mutans* y *Streptococcus salivarius* productoras de mutacina 1140 y salivaricinas A2 y B, respectivamente) pueden ser útiles para el tratamiento de este tipo de faringitis, por lo que podrían utilizarse como terapia de sustitución de antibióticos (Tagg, 2004; Cotter *et al.*, 2005b).
7. Tratamiento de las infecciones pulmonares por *Ps. auruginosa* mediante la administración de piocinas modificadas genéticamente (Michel-Briand y Baysse, 2002; Gillor *et al.*, 2005).
8. Prevención y tratamiento de infecciones producidas por bacterias patógenas entéricas (por ej.: *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *Campylobacter* spp.) mediante la administración de cepas de bacterias Gram-negativas productoras de bacteriocinas (colicinas o microcinas) o de bacteriocinas (producidas por *Bacillus* spp. o *Paenibacillus* spp.) microencapsuladas que, posiblemente, reducen o previenen la adquisición de nuevas cepas patógenas (Zhao *et al.*, 1998; Gillor *et al.*, 2005; Cole *et al.*, 2006; Diez-Gonzalez, 2007).
9. Tratamiento de infecciones virales. La cinamicina, lantiopeptina y la enterocina CRL35 (EntCRL35), producidas por *Streptomyces* spp., *Streptoverticillium cinnamoneum* y *Enterococcus mundtii* CRL35, respectivamente, inhiben la replicación del virus herpes simple (Naruse *et al.*, 1989; Ryan *et al.*, 2002; Wachsmann *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito que la enterocina ST4V (EntST4V) producida por *E. mundtii* ST4V inactiva diversos virus (Todorov *et al.*, 2005).

Por otra parte, debido a la actividad antimicrobiana de algunas bacteriocinas frente a bacterias ruminales Gram-positivas (productoras de metano y amonio) y a la presencia en el rumen de bacterias bacteriocinogénicas, se ha sugerido la posible utilidad de las bacteriocinas como aditivos alimentarios para el ganado, como una alternativa al empleo de antibióticos ionóforos (sustancias con actividad antimicrobiana derivada de su capacidad de ligar y transportar iones a través de las membranas biológicas que se emplean como promotores de crecimiento), con el objeto de mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal limitando la pérdida de energía y nitrógeno a través de la producción microbiana de metano y amonio, respectivamente. En este contexto, una posible ruta de administración sería mediante ensilados fermentados por bacterias bacteriocinogénicas (Kalmokoff *et al.*, 1996; Lauková y Czikková, 1998; Mantovani y Russell, 2002; Russell y Mantovani, 2002; Cookson *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005b; Diez-Gonzalez, 2007). Además, debido a la potente actividad antimicrobiana de algunas bacteriocinas, se ha sugerido su empleo con diversas finalidades, entre las que destacan:

1. Tratamiento de aguas de deshecho procedentes de granjas (purines), ya que algunas bacteriocinas (por ej.: enterocina V24) inhiben a bacterias patógenas Gram-positivas (por ej.: *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.) y, en ocasiones, a Gram-negativas (por ej.: *Yersinia enterocolitica*) presentes en estos sustratos (Lauková *et al.*, 1998a, 2000).
2. Tratamiento de semillas de alfalfa con bacteriocinas (por ej.: colicina del tipo E2) para evitar la incidencia de *E. coli* O157:H7 en brotes de alfalfa (Nandiwada *et al.*, 2004).
3. Conservación de cosméticos y desodorantes a los que se adicionan bacteriocinas (por ej.: gallidermina) (Ryan *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005a).

4. Prevención de la colonización por bacterias Gram-positivas y por *E. coli* de catéteres tratados con NisA y colicinas, respectivamente (Bower *et al.*, 2001, 2002; Gillor *et al.*, 2005; Trautner *et al.*, 2005).
5. Tratamiento y prevención de diversas infecciones bacterianas vegetales, ya que algunas bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativas (por ej.: piocinas) inhiben a bacterias patógenas productoras de enfermedades en diversas especies vegetales (Gillor *et al.*, 2005).

Por último, se ha descrito que, además de la actividad antimicrobiana, las bacteriocinas poseen otras actividades diferentes y se ha sugerido/propuesto su empleo con las siguientes finalidades:

1. Inmunopotenciación y regulación de la presión sanguínea. Los lantibióticos duramicina y ancovenina, producidos por *Streptomyces* spp. y *Streptoverticillium* spp., y cinamicina, producida por *Streptomyces* spp., tienen efecto inmunomodulador y regulador de la presión sanguínea derivado de su actividad inhibidora de la función de la enzima fosfolipasa A2 (relacionada con la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos) y enzima convertidora de angiotensina (ACE, del inglés *Angiotensin Converting Enzyme*) (Ryan *et al.*, 2002).
2. Tratamiento anticonceptivo y espermicida. Se ha descrito que NisA es eficaz como anticonceptivo (Aranha *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005b) y que Ltn3147 y subtilisina A son eficaces como espermicidas (Silkin *et al.*, 2008).
3. Agentes potencialmente anticancerígenos, debido a la capacidad de algunas bacteriocinas (por ej.: colicinas y microcinas) de inhibir el crecimiento de las células eucariotas mediante la inducción de apoptosis o muerte celular programada (Hetz *et al.*, 2002; Gillor *et al.*, 2005).
4. Tipificación de microorganismos causantes de infecciones nosocomiales mediante la determinación del patrón de producción de bacteriocinas frente a un conjunto estándar de microorganismos indicadores o del patrón de susceptibilidad frente a un conjunto estándar de bacteriocinas, si bien el empleo de esta técnica es poco frecuente, salvo en los casos cuyo tipado resulta difícil con los métodos usuales (por ej.: micobacterias y bacilos Gram-negativos) y, además, requiere que se utilicen otros métodos de tipificación (Daw y Falkner, 1996).

II.3. BACTERIAS LÁCTICAS

II.3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

Las bacterias lácticas constituyen un grupo de microorganismos muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico, fisiológico y filogenético, pertenecientes al grupo clostridial de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C <55 mol%), con exigentes requerimientos nutritivos y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono. En general, las bacterias lácticas son microorganismos de morfología cocoide, bacilar o cocobacilar, no esporulados, catalasa-negativos, carentes de citocromos, microaerófilos o anaerobios facultativos, ácido-tolerantes y estrictamente fermentativos (Stiles y Holzapfel, 1997; Axelsson *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c; Carr *et al.*, 2002).

En la actualidad, los géneros bacterianos comprendidos en el grupo de las bacterias lácticas son: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Pot *et al.*, 1994; Stiles y Holzapfel, 1997; Axelsson *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c, 2001; Claesson *et al.*, 2007; Ogier y Serror, 2008; Ogier *et al.*, 2008). Tradicionalmente, también se consideraba al género *Bifidobacterium* como perteneciente al grupo de las bacterias lácticas ya que posee las características morfológicas y fisiológicas comunes descritas previamente. Sin embargo, filogenéticamente están más relacionadas con el grupo actinomiceto de las eubacterias Gram-positivas (contenido de G+C >55 mol%) y además poseen una ruta especial para la fermentación de los azúcares, específica para este género (catalizada por la enzima fructosa-6-fosfato fosfoetolasa), lo que las separa claramente del grupo de las bacterias lácticas (Axelsson *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c).

Las bacterias lácticas se localizan en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de hidratos de carbono solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno, como pueden ser diversos alimentos como la leche y los productos lácteos, la carne y los productos cárnicos fermentados, el pescado y los derivados de la pesca, las frutas y hortalizas frescas y los productos vegetales fermentados, los ensilados y diversas bebidas. Sin embargo, también forman parte de la microbiota normal del tracto gastrointestinal y urogenital y de las mucosas de los mamíferos. Además, algunas bacterias lácticas también se han aislado del estiércol y de las aguas residuales urbanas e industriales (Aguirre y Collins, 1993; Axelsson *et al.*, 1998; Cintas *et al.*, 2000c; Carr *et al.*, 2002).

II.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas, además de su función tecnológica, poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de un gran número de microorganismos patógenos y/o alterantes presentes potencialmente en los alimentos. El efecto antimicrobiano primario de las bacterias lácticas se debe a la competencia por los nutrientes del sustrato y a la formación de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético, principalmente), con el consiguiente descenso del pH. No obstante, las bacterias lácticas también producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno, isómeros D de los aminoácidos, reuterina y otros compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular, y, por último, sustancias proteicas de síntesis ribosomal denominadas bacteriocinas (Daeschel, 1989; Piard y Desmazeaud, 1991, 1992; Vandenberg, 1993; de Vuyst y Vandamme, 1994b; Adams y Nicolaidis, 1997; Cintas y Casaus, 1998; Ouwehand, 1998; Caplice y Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Cintas *et al.*, 2000a, b, 2001; Ross *et al.*, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Galvez *et al.*, 2007). De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente para la bioconservación de los alimentos (secciones II.2.2.4.1 y II.3.4.10), ya que por su naturaleza proteica podrían ser degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal mientras permanecen activas en el

sustrato alimenticio en el que se encuentran y, además, no parecen ser tóxicas ni inmunógenas (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996, Cintas *et al.*, 2000b).

II.3.3. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacterias lácticas son microorganismos de gran importancia no sólo en la industria alimentaria, por su aplicación en la elaboración de una gran variedad de alimentos fermentados, sino también en la industria farmacéutica, ya que son la base de la mayoría de las preparaciones probióticas (sección II.3.3.2.1). Además, las bacterias lácticas pueden emplearse como biorreactores para la producción de sustancias interés para la industria alimentaria y farmacéutica (por ej.: péptidos, proteínas, sustancias “nutracéuticas” y vacunas orales) (secciones II.3.3.2.2 y II.3.3.2.3). No obstante, también se ha relacionado a las bacterias lácticas con la alteración de diversos alimentos, formación de aminos biógenos e, incluso, con la producción de enfermedades (secciones II.3.3.1.1 y II.3.3.3) (Aguirre y Collins, 1993; de Vuyst y Vandamme, 1994a; Salminen y von Wright, 1998; Konings *et al.*, 2000; Samelis *et al.*, 2000; Hugenholtz *et al.*, 2002). Tampoco conviene olvidar el efecto nutricional y saludable de la ingestión de bacterias lácticas viables en los consumidores. A este respecto, se ha hipotetizado, y algunas veces demostrado, que las bacterias lácticas incrementan la calidad nutritiva de los alimentos, controlan infecciones intestinales, facilitan la digestión de la lactosa, inhiben el desarrollo de algunos tipos de cáncer, poseen actividad antimutagénica, modulan la respuesta inmune mediada por células y reducen los niveles de colesterol sanguíneo (Yasui *et al.*, 1999).

II.3.3.1. BACTERIAS LÁCTICAS Y ALIMENTOS

Los alimentos fermentados han sido consumidos por la humanidad desde tiempos inmemoriales y parecen tener su origen en la civilización Sumeria (5.000–4.000 a.C.). Tradicionalmente, estos alimentos fermentados se elaboraban mediante procesos empíricos basados en la actividad de la microflora presente de forma natural en las materias primas (fermentaciones naturales) (Cintas y Casaus, 1998). En la actualidad, estos productos incluyen más de 3.500 variedades, elaboradas a partir de materias primas como la leche, frutas, vegetales, raíces, cereales, carne y pescado, entre los que se incluyen: (i) derivados de la leche fermentada (por ej.: queso, yogur y “*kéfir*”); (ii) pan y derivados de cereales fermentados (por ej.: “*sourdough*” [derivado de diversos cereales] y “*ogi*” [derivado del maíz o sorgo]); (iii) bebidas (por ej.: vino, cerveza y diversos licores); (iv) derivados de vegetales fermentados (por ej.: ensilados, “*Kimchi*” [derivado de la col y otros vegetales], “*Sauerkraut*” [derivado de la col] y “*Tempeh*” [derivado de la soja]) y (v) derivados del pescado fermentado. Sin embargo, hasta mediados del siglo XIX Pasteur no demostró que los microorganismos eran los responsables de los procesos fermentativos que tenían lugar en todos estos alimentos (Stiles, 1996; Wood, 1998; Caplice y Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Ross *et al.*, 2002).

Actualmente, las fermentaciones industriales son procesos estrictamente controlados basados en la adición deliberada a la materia prima de cultivos de microorganismos específicos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) (Tabla II.6), lo que permite garantizar y estandarizar las características

organolépticas y reológicas del producto final, así como potenciar su calidad higiénico-sanitaria y alargar su vida útil (Cintas y Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2000a). Además, el empleo de la fermentación como tecnología alimentaria cumple varias funciones: (i) enriquecimiento de la dieta humana debido a la amplia diversidad de alimentos fermentados, (ii) conservación de los alimentos derivada de la fermentación láctica, alcohólica o acética, (iii) enriquecimiento de materias primas con vitaminas, proteínas y aminoácidos y ácidos grasos esenciales, (iv) detoxificación durante la fermentación de los alimentos y (v) descenso del tiempo requerido para su preparación (Steinkraus, 2002; Giraffa, 2004). Estos microorganismos, que se adicionan a los alimentos fermentados, pueden clasificarse en función de su finalidad principal en: (i) cultivos iniciadores, que se adicionan para inducir cambios en la textura, aroma, sabor, color, digestibilidad y palatabilidad de las materias primas, permitiendo así la obtención de unos productos finales con unas características organolépticas y reológicas diferentes y deseables (Buckenhüskes, 1993; Geisen y Holzapfel, 1996; Stiles, 1996; Cintas y Casaus, 1998; Hugas, 1998; Lücke, 2000; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Tamine, 2002; Leroy y de Vuyst, 2003; Smit *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2006); (ii) cultivos protectores, adicionados para asegurar la calidad higiénico-sanitaria y seguridad de los alimentos, así como para incrementar su vida útil mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos debido a la competencia por los nutrientes del sustrato y la producción de diversos metabolitos (sección II.3.2) (Holzapfel *et al.*, 1995; Geisen y Holzapfel, 1996; Lücke, 2000; Rodgers, 2001; Rodgers *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2002; Työppönen *et al.*, 2003; Vermeiren *et al.*, 2004) y (iii) cultivos adjuntos (también denominados cultivos iniciadores adjuntos), adicionados con una finalidad distinta a las anteriores, como puede ser la aceleración de la maduración mediante la lisis celular de los cultivos iniciadores durante la elaboración de determinados tipos de quesos y la producción del sabor y aroma deseado (O'Sullivan *et al.*, 2002a).

II.3.3.1.1. Aspectos negativos de la presencia de bacterias lácticas en los alimentos

La actividad metabólica de las bacterias lácticas provoca, en algunas ocasiones, la alteración de determinados alimentos cuando éstas se convierten en la flora dominante durante su almacenamiento, como es el caso de: (i) carnes envasadas en condiciones de anaerobiosis o en atmósferas modificadas, en las que producen acidez, sabores y olores defectuosos, exudados lechosos y limosidad, la hinchazón de los envases por producción de gas y decoloración (Borch *et al.*, 1996; Björkroth *et al.*, 2000; Samelis *et al.*, 2000; Vermeiren *et al.*, 2004); (ii) ciertos vinos en los que la fermentación maloláctica es indeseable, ya que producen agriado, sabores defectuosos, turbidez, lodos, decoloración y viscosidad; estas alteraciones también pueden producirse por el desarrollo de otras bacterias lácticas que no intervienen en la fermentación maloláctica (Daeschel *et al.*, 1991; Fleet, 1999, 2001) y (iii) cervezas, en las que provocan la aparición de acidez excesiva, sabores y aromas defectuosos, turbidez, filamentosidad, sedimentos, viscosidad y decoloración (sección II.1.7.1) (Fernandez y Simpson, 1995; Jespersen y Jakobsen, 1996; Campbell, 1997; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto, 2002; Sakamoto y Konings, 2003; March *et al.*, 2005).

Tabla II.6. Microorganismos adicionados durante las fermentaciones industriales como cultivos iniciadores, protectores y/o adjuntos

	Producto	Microorganismo	Sustrato
Bebidas	Cerveza y vino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y bacterias lácticas	Cereales, lúpulo y uvas
Carne	<i>Mahewu</i> (Sudáfrica)	Bacterias lácticas	Maíz
	Embutidos fermentados	Bacterias: <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>Streptococcus carnosus</i> y <i>Micrococcus varians</i> Levaduras: <i>Debaromyces hansenii</i> y <i>Candida famata</i> Mohos: <i>Penicillium nalgiovense</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	Carne de ternera y de cerdo
Cereales	Pan	<i>Sc. cerevisiae</i> y bacterias lácticas	Trigo, centeno y otros cereales
	<i>Idli</i> (India)	<i>Torulopsis</i> spp., <i>Candida</i> spp., <i>Trichosporon pullulans</i> y bacterias lácticas	Arroz y lentejas
	<i>Nan</i> (India)	<i>Sc. cerevisiae</i> y bacterias lácticas	Harina de trigo
Leche	<i>Ogi</i> (Nigeria)	Bacterias lácticas, hongos y levaduras	Maíz
	Queso	Bacterias: <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subesp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Propionibacterium</i> spp. Mohos (<i>Penicillium roqueforti</i> en quesos azules) y levaduras	Leche
	Yogur	<i>St. thermophilus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Leche
	Kéfir	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> y <i>Torulla</i> spp.	Leche
Pescado	Leche acidófila	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Lb. delbrueckii</i> subesp. <i>bulgaricus</i>	Leche
Postres		<i>C. piscicola</i> y <i>Carnobacterium divergens</i>	Pescado
	<i>Bongkrek</i> (Indonesia)	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Coco
Vegetales y frutas	<i>Oncom</i> (Indonesia)	<i>Neurospora intermedia</i> o <i>R. oligosporus</i>	Cacahuete
	Salsa de soja	<i>Aspergillus oryzae/soyae</i> , <i>Lactobacillus</i> spp. y <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Haba de soja y trigo
	<i>Sauerkraut</i>	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lc. lactis</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Col, repollo
	<i>Gari</i> (África)	<i>Corynebacterium manihot</i> y bacterias lácticas	Raíz de cassava
	<i>Kimchi</i> (Korea)	Bacterias lácticas	Col, repollo
	<i>Tempeh</i> (Indonesia)	<i>R. oligosporus</i>	Haba de soja
	<i>Pickles</i>	<i>Pediococcus cerevisiae</i> y <i>Lb. plantarum</i>	Pepinillo en vinagre
	Aceitunas	<i>Le. mesenteroides</i> y <i>Lb. plantarum</i>	Aceitunas
	Zumos	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lc. lactis</i> y <i>Le. mesenteroides</i>	Fruta

Adaptado de Caplice y Fitzgerald (1999) y de Ross et al. (2002).

Por otra parte, las enzimas descarboxilasas de algunas bacterias lácticas presentes en los alimentos podrían provocar la formación de aminas biógenas (por ej.: tiramina, putrescina y cadaverina), que son sustancias psico- y vasoactivas. A este respecto, conviene destacar que, a pesar de que la presencia de estas sustancias es común en los alimentos fermentados (por ej.: queso, vino, cerveza y embutidos crudos curados), su ingestión en grandes cantidades pueden originar cuadros toxicológicos (náuseas, alteraciones respiratorias, sofocos, sudoración, palpitaciones, dolor de cabeza, erupciones cutáneas e hiper- o hipotensión) (Buckenhüskes, 1993; Giraffa, 2002; Suzzi y Gardini, 2003).

II.3.3.2. BACTERIAS LÁCTICAS Y SALUD

II.3.3.2.1. Bacterias lácticas como cultivos probióticos

Actualmente, el termino probiótico engloba a cultivos mixtos o monoespecíficos de microorganismos vivos y a componentes de las células microbianas que ejercen efectos beneficiosos en la salud y el bienestar del hospedador, en algunos casos como consecuencia de la mejora de las

propiedades de su microflora indígena (Salminen *et al.*, 1999; Shortt, 1999). La mayoría de las preparaciones probióticas (especialidades farmacéuticas) y de los alimentos probióticos (alimentos infantiles, leche, derivados lácteos y aditivos alimentarios animales) incluyen microorganismos del género *Bifidobacterium* y del grupo de las bacterias lácticas, principalmente del género *Lactobacillus*. Sin embargo, algunas cepas de las especies *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* también se emplean ocasionalmente como probióticos en humanos y animales, respectivamente (sección II.4.3.2) (Holzapfel *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1998; Holzapfel y Schillinger, 2002; Leroy *et al.*, 2006). En este contexto, la elección de cepas bacterianas para su empleo como probióticos se basa en el aislamiento de microorganismos comensales de las mucosas oral, gastrointestinal y genitourinaria de individuos sanos de la misma especie, así como en la selección posterior de los microorganismos con potencial probiótico que cumplan los siguientes requisitos: (i) tolerancia a bajos niveles de pH, al jugo gástrico y a las sales biliares; (ii) adherencia a células intestinales e inmunoestimuladoras; (iii) proliferación y colonización del tracto gastrointestinal; (iv) inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos, mediante la producción de sustancias antimicrobianas o a través de mecanismos de exclusión competitiva; (v) seguridad e inocuidad (genéticamente estable, no patógeno, no tóxico, no alergénico y no mutagénico o carcinogénico); (vi) ausencia de factores de virulencia y de resistencias adquiridas a antibióticos y (vii) supervivencia, viabilidad y crecimiento durante la elaboración, transporte y almacenamiento de los alimentos e interacción con cultivos iniciadores y/o sustancias prebióticas (Lee y Salminen, 1995; Salminen *et al.*, 1996; Gardiner *et al.*, 2002; Saarela *et al.*, 2002).

Por otra parte, entre los numerosos efectos beneficiosos derivados del consumo de probióticos se incluyen: (i) mantenimiento y la restauración de la microflora intestinal normal, previniendo y reduciendo las alteraciones gastrointestinales; (ii) inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos; (iii) fortalecimiento de la barrera de la mucosa intestinal; (iv) actividades antimutagénicas y anticarcinogénicas; (v) modulación del sistema inmune; (vi) reducción del nivel de colesterol sanguíneo; (vii) actividad antioxidante; (viii) mejora en la absorción del calcio; (ix) aumento de la síntesis de vitaminas y mejora de la predigestión de proteínas; (x) acción hipertensiva; (xi) disminución de las infecciones urogenitales y de las úlceras causadas por *H. pylori*; (xii) tratamiento de las diarreas causadas por viajes a zonas tropicales y tratamiento excesivo con antibióticos; (xiii) control de colitis provocada por rotavirus y *Cl. difficile*; (xiv) mejora de la calidad nutritiva de los alimentos y (xv) mejora de la digestibilidad de la lactosa (Holzapfel *et al.*, 1998; Gardiner *et al.*, 2002; Holzapfel y Schillinger, 2002; Ouwehand *et al.*, 2002; Wallace *et al.*, 2003; Tsai *et al.*, 2004; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ljungh y Wadström, 2006; Bujalance *et al.*, 2007; Falagas *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2007).

II.3.3.2.2. Bacterias lácticas como vacunas orales

Mediante ingeniería genética es posible obtener bacterias lácticas recombinantes que expresen, intra-, extracelularmente o unidos a la superficie celular, epítomos o determinantes antigénicos (región específica de un antígeno reconocidas por los anticuerpos) de microorganismos patógenos y que, por lo tanto, puedan utilizarse como vacunas administradas por vía oral. El hecho de que las bacterias lácticas sean candidatas para el desarrollo de vacunas orales se deriva de algunas de sus propiedades como: (i)

su consideración, generalmente, como microorganismos seguros o de “grado alimentario” (GRAS, del inglés *Generally Recognized as Safe*), o su término equivalente europeo QPS (del inglés *Qualified Presumption of Safety*), sugerido recientemente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria; (ii) sus propiedades adyuvantes (potenciadoras de la respuesta inmune); (iii) su baja capacidad de provocar una respuesta inmune intrínseca; (iv) su capacidad de adherencia y colonización de las mucosas y (v) su resistencia a valores de pH ácidos (Pouwels *et al.*, 1998; Dieye *et al.*, 2003; Wells y Mercenier, 2003; Hummel *et al.*, 2007b).

II.3.3.2.3. Bacterias lácticas como productoras de sustancias nutraceuticas

De la misma manera que las bacterias lácticas pueden emplearse como biorreactores para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés en el sector alimentario (Billman-Jacobe, 1996; Hugenholtz *et al.*, 2002), es posible modificar, mediante ingeniería genética, determinadas rutas metabólicas de las bacterias lácticas para la producción, a gran escala, de sustancias nutraceuticas (componentes de los alimentos que poseen efectos beneficiosos para la salud del consumidor), tales como: (i) vitaminas del grupo B (por ej.: riboflavina, folatos y cobalamina); (ii) edulcorantes bajos en calorías (por ej.: L-alanina, manitol, sorbitol y tagatosa); (iii) oligosacáridos; (iv) exopolisacáridos y (v) antioxidantes (por ej.: glutatión y tioredoxina) (Hugenholtz *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2006).

II.3.3.3. BACTERIAS LÁCTICAS Y ENFERMEDAD

Los consumidores perciben a las bacterias lácticas como algo “natural” y beneficioso para la salud, por lo que su presencia en los alimentos tiene gran aceptabilidad. Por otra parte, su presencia es ubicua en el tracto intestinal humano y, además, la mayoría de las cepas son microorganismos comensales sin potencial patógeno. Por todo ello, se ha aceptado la seguridad e inocuidad, para el consumo humano, de las bacterias lácticas asociadas a los alimentos y, en la actualidad, se consideran, generalmente, microorganismos seguros (GRAS y/o QPS) (Adams y Marteau, 1995; Donohue *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Stiles, 1996). No obstante, también se ha relacionado a las bacterias lácticas con el desarrollo de infecciones humanas (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994), si bien las bacterias lácticas son una causa relativamente rara de infecciones humanas y, además, se considera que poseen un potencial patógeno reducido. En este contexto, el incremento aparente de los casos de infecciones causadas por bacterias lácticas no se debe a un incremento de su patogenicidad intrínseca, sino a la combinación de un mejor diagnóstico clínico y al incremento en la supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias. Por otra parte, en los casos clínicos descritos, las bacterias lácticas actúan como microorganismos patógenos oportunistas que infectan sólo a individuos cuyas defensas están, de alguna manera, debilitadas como resultado de disfunciones del sistema inmune, quimioterapia o daño tisular. Además, su prevalencia es menor que la de otros microorganismos patógenos oportunistas (Adams, 1999).

Entre las infecciones producidas por bacterias lácticas destacan tanto infecciones locales como sistémicas: endocarditis infecciosa, septicemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de la cavidad torácica, infecciones del tracto digestivo y meningitis. Por otra parte, la mayoría de las bacterias lácticas asociadas a casos clínicos pertenecen a las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (sección

II.4.2), aunque, en ocasiones, se han descrito infecciones causadas por *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lc. lactis*, *Lactococcus garviae* y *Leuconostoc* spp. (Aguirre y Collins, 1993; Gasser, 1994; Donohue *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998; Adams, 1999; Claesson *et al.*, 2007; Mofredj *et al.*, 2007; Švec *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Ogier y Serror, 2008; Ogier *et al.*, 2008). No obstante, es conveniente destacar que: (i) estas infecciones suelen estar asociadas a enfermedades subyacentes que predisponían a la infección, (ii) el origen de los microorganismos implicados suele ser la microflora habitual del paciente y (iii) los microorganismos implicados no han sido cepas de origen alimentario o farmacéutico (Adams y Marteau, 1995; Donohue *et al.*, 1995; Salminen *et al.*, 1998; Adams, 1999).

II.3.4. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias antimicrobianas de síntesis ribosomal que varían en sus propiedades físico-químicas, espectro de acción antimicrobiana, modo de acción, mecanismos responsables de su inmunidad, biosíntesis, procesamiento, transporte y regulación de su producción y en la organización molecular de los determinantes genéticos implicados en estos procesos (Cintas *et al.*, 2000b; Martínez *et al.*, 2000c, d; Cintas *et al.*, 2001). Durante los últimos años, debido a la posible aplicación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas en la bioconservación de los alimentos, se ha producido un extraordinario avance en su investigación, lo que ha permitido elucidar su estructura, sus características físico-químicas, su modo de acción, la localización de sus determinantes genéticos y los mecanismos de biosíntesis, procesamiento, secreción, inmunidad y regulación (Sablon *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Nes *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006).

II.3.4.1. CLASIFICACIÓN

A pesar de la heterogeneidad de su tamaño molecular, propiedades bioquímicas, espectro de acción antimicrobiana y organización genética, las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas presentan una serie de características comunes que permiten agruparlas en alguna de las tres clases principales descritas para las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram-positivas (Tabla II.7) (sección II.2.2.2.2) (Nes *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006):

1. Clase I (lantibióticos): bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<5 kDa), termoestables y con aminoácidos inusuales resultantes de modificaciones postraduccionales (Sahl y Bierbaum, 1998; Guder *et al.*, 2000; Pag y Sahl, 2002a; Twomey *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2005; Dufour *et al.*, 2007). Las modificaciones postraduccionales más comunes son: (i) la deshidratación de residuos de serina (Ser) y treonina (Tre), que origina deshidroalanina (Dha) y deshidrobutirina (Dhb), respectivamente, y (ii) la condensación de residuos Dha y Dhb con grupos sulfhidrilos de residuos de cisteína (Cys) cercanos, que origina lantionina (Lan) y β -metil-lantionina (MeLan), respectivamente. El prototipo de esta clase es NisA, que, además, es la bacteriocina mejor caracterizada hasta la fecha y la única aceptada internacionalmente como aditivo alimentario en determinados alimentos (sección II.3.4.10) (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Davies y Delves-

Broughton, 2000; Cheigh y Pyun, 2005). En función de su estructura y modo de acción, los antibióticos se subdividen, a su vez, en dos grupos:

- a. Tipo Ia: antibióticos elongados, flexibles y catiónicos que actúan a nivel de membrana formando poros. Este grupo se subdivide en: (i) subgrupo Ia1, que incluye los antibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo FNLDV (sección II.3.4.7.1), es procesada por una serina-proteasa (por ej.: NisA y nisina Z [NisZ]) y (ii) subgrupo Ia2, que incluye los antibióticos elongados cuya secuencia líder, del tipo “doble glicina” (sección II.3.4.7.1), es procesada por un transportador del tipo ABC, como es el caso de Ltn481 y de todos los sistemas de dos péptidos (por ej.: citolisina [Cyl]), cuya actividad total depende de la acción complementaria de dos péptidos con actividad antimicrobiana débil de manera individual, pero potente cuando actúan conjuntamente (Nagao *et al.*, 2006; Lawton *et al.*, 2007).
 - b. Tipo Ib: antibióticos globulares, aniónicos o neutros e hidrófobos, inmunológicamente activos, que actúan como inhibidores de enzimas (por ej.: mersacidina, cinamicina, actagardina y duramicinas B y C). Conviene destacar que, hasta la fecha, no se ha descrito ningún antibiótico de este tipo producido por bacterias lácticas (Skaugen *et al.*, 2003).
2. Clase II (no antibióticos): bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables, con un punto isoelectrico elevado (pI 8–11), sin aminoácidos modificados postraduccionalmente y que actúan a nivel de la membrana citoplasmática (Nes y Holo, 2000; Nes *et al.*, 2002; Drider *et al.*, 2006). Tradicionalmente las bacteriocinas de la clase II se han subdividido en tres grupos:
- a. Subclase IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina): bacteriocinas con una potente actividad anti-*Listeria* y con un elevado grado de homología estructural (40–60%), especialmente en la región N-terminal, en el que aparece la secuencia consenso conservada YGNGVXCX₄CXV (donde X representa un residuo aminoacídico no conservado) que incluye dos residuos cisteína (Cys) que forman un puente disulfuro esencial para la actividad antimicrobiana (por ej.: enterocina P [EntP]) (Ennahar *et al.*, 1999, 2000; Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006). El espectro de acción de todas las bacteriocinas de esta subclase es muy amplio e incluye generalmente tanto a otras bacterias lácticas como a microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos (*Bacillus* spp., *Brochotrix* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp. y *Staphylococcus* spp.). El prototipo de este grupo es la pediocina PA-1 (PedPA-1) (Henderson *et al.*, 1992; Marugg *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), que es la bacteriocina de las bacterias lácticas mejor caracterizada después de NisA.
 - b. Subclase IIb (sistemas de dos péptidos): bacteriocinas cuya actividad antimicrobiana total depende de la acción complementaria de dos péptidos (Cintas *et al.*, 1998a; Garneau *et al.*, 2002; Oppegård *et al.*, 2007). Estos sistemas se clasifican, a su vez, en dos tipos: (i) sistemas en los que los dos péptidos no poseen actividad antimicrobiana independiente, por lo que es necesaria su presencia simultánea para que la bacteriocina sea activa (por ej.: lactococcina G [α y β]) y (ii) sistemas en los que uno o ambos péptidos son activos independientemente, pero cuya actividad aumenta notablemente en presencia del otro péptido (por ej.: lactacina F [A y B] y enterocina L50 [L50A y L50B], respectivamente).

- c. Subclase IIc: bacteriocinas de la clase II que no se incluyen en ninguna de las subclases anteriores (por ej.: carnobacteriocina A [CbnA], enterocina B [EntB] y enterocina Q [EntQ]).
- 3. Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles (inactivadas con tratamientos térmicos a 60–100°C durante 10–15 min) (por ej.: helveticina J y enterolisina A [EnlA]).

Conviene destacar que Klaenhammer (1993) propuso la existencia de una cuarta clase, compuesta por bacteriocinas complejas e integradas por una parte proteica y una o más fracciones lipídicas y/o glucídicas necesarias para su actividad biológica. No obstante, antes de reconocer a esta clase como independiente, debe completarse la caracterización bioquímica de todas las bacteriocinas inicialmente adscritas a esta clase, purificándolas a homogeneidad, ya que en algunos casos, tras su purificación se demostró que su naturaleza era exclusivamente peptídica (Jiménez-Díaz *et al.*, 1995). Por otra parte, Kemperman *et al.* (2003) sugirieron la existencia de una nueva clase constituida por bacteriocinas con una estructura cíclica resultante de la formación de un enlace peptídico entre las regiones N- y C-terminal de la molécula y que no presentan aminoácidos modificados postraduccionalmente (por ej.: circularina A [CirA], EntAS-48, gassericina A [GasA] y reutericina 6) (Kawai *et al.*, 2004; Maqueda *et al.*, 2004, 2008), no obstante, en dos revisiones recientes estas bacteriocinas se han incluido como una subclase de la clase II (Cotter *et al.*, 2005b; Nes *et al.*, 2007). Asimismo, Cotter *et al.* (2005b) han designado a todos los compuestos termolábiles y de elevado tamaño molecular, tradicionalmente agrupados en la clase III, como bacteriolisinas (hidrolasas de la mureína), excluyéndolos así del grupo de las bacteriocinas, ya que difieren de las bacteriocinas tradicionales en: (i) su mecanismo de acción, ya que provocan la lisis celular mediante la hidrólisis de la pared bacteriana, (ii) su estructura modular, compuesta por un dominio N-terminal catalítico con homología con endopeptidasas y un dominio C-terminal implicado en el reconocimiento de su diana celular y (iii) la posible ausencia de gen(es) de inmunidad en sus operones, ya que la inmunidad de la célula productora puede depender de modificaciones en su pared bacteriana. Por otra parte, Nes *et al.* (2007) han dividido a las bacteriocinas pertenecientes a la clase II en cuatro subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina); (ii) IIb (sistema de dos péptidos); (iii) IIc (bacteriocinas sin extensión N-terminal) y (iv) IId (bacteriocinas con estructura cíclica). No obstante, De Vuyst y Leroy (2007) han dividido a las bacteriocinas de la clase II en sólo tres subclases: (i) IIa (bacteriocinas del tipo/familia pediocina); (ii) IIb (sistema de dos péptidos) y (ii) IIc (bacteriocinas con estructura cíclica). Finalmente, en una revisión reciente Franz *et al.* (2007) proponen la existencia de cuatro grupos de bacteriocinas producidas por el género *Enterococcus* (enterocinas) basándose en sus modificaciones postraduccionales y secuencias aminoacídicas: (i) clase I (lantibióticos); (ii) clase II (no lantibióticos de pequeño tamaño molecular), dividida a su vez en: enterocinas del tipo/familia pediocina (II.1.), enterocinas sintetizadas sin extensión N-terminal (II.2.) y enterocinas que no pertenecen a las subclases anteriores (II.3.); (iii) clase III (enterocinas circulares) y (iv) clase IV (enterocinas de gran tamaño molecular). Considerando lo descrito anteriormente en este trabajo se propone una modificación de la clasificación de las bacteriocinas propuesta por Nes *et al.* (2007) (Tabla II.7).

Tabla II.7. Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas

Clase	Características generales	Subclase ^a	Características particulares	Ejemplos
I	Lantibióticos: péptidos de pequeño tamaño molecular (<5kDa) con aminoácidos modificados postraduccionalmente (Dha, Dhb, Lan y MeLan)	Ia1	Péptidos elongados y flexibles procesados por una serina-proteasa	Lactocina S Nisinas A y Z
		Ia2	Péptidos elongados y flexibles procesados por un transportador del tipo ABC	Lactocina 481 Lactococcina S Plantaricina C
			Sistema de dos péptidos	Citolisina (L _L y L _S) Lactocina 3147 (A1 y A2) Plantaricina W (α y β)
II	No lantibióticos: péptidos de pequeño tamaño molecular (<10 kDa) y termoestables con una potente actividad anti- <i>Listeria</i>	IIa	Secuencia consenso N-terminal YGNGVXCX ₄ CXV ^b	Enterocinas A, P Pediocina PA-1 Sakacinas A y P
		IIb	Sistemas de dos péptidos	Enterocina L50 (L50A y L50B) Lactocina F (A y B) Plantaricinas EF y JK
		IIc	Sin extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal)	Enterocina L50 (L50A y L50B), Q y EJ97
		IId	Estructura cíclica	Enterocina AS-48 Gassericina A
		IIe	-	Carnobacteriocina A Enterocina B Lactococcina A
III	Proteínas termosensibles de elevado tamaño molecular (>30 kDa)	-	-	Enterolisina A Helveticina J Lactacinas A y B

^aHasta la fecha no se ha descrito ningún lantibiótico del subgrupo IIb producido por bacterias lácticas.

^bX representa un residuo aminoacídico no conservado. *Adaptado de Nes et al. (2007).*

II.3.4.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y ESTRUCTURA

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son de naturaleza peptídica y, por lo tanto, se inactivan presumiblemente por la acción de enzimas proteolíticas de origen gástrico (pepsina) y/o pancreático (tripsina y quimiotripsina) (Gänzle *et al.*, 1999; Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b). Esta propiedad es interesante desde el punto de vista de la seguridad de estos compuestos, ya que, en el caso de emplearse como bioconservantes en la industria alimentaria, la ecología del tracto digestivo de los consumidores no resultaría afectada (Piard y Desmazeaud, 1991; Bernbom *et al.*, 2006).

En lo que respecta a su composición aminoacídica, los lantibióticos (clase I) constituyen una clase especial de bacteriocinas policíclicas caracterizadas por la presencia de aminoácidos modificados postraduccionalmente (Dha, Dhb, Lan y MeLan). Por otra parte, las bacteriocinas de las clases II y III carecen de modificaciones postraduccionales, con la excepción de la formación de una estructura cíclica en EntAS-48 (bacteriocina Bac21) (Martínez-Bueno *et al.*, 1994), CirA (Kemperman *et al.*, 2003), GasA (Kawai *et al.*, 2004) y reutericina 6 (Kawai *et al.*, 2004), y del establecimiento de puentes disulfuro entre los residuos Cys (2–4) de las bacteriocinas de la clase IIa (Casaus, 1998; Eijssink *et al.*, 1998). A este respecto, Klaenhammer (1993) clasificó las bacteriocinas en tres grupos en función de su contenido en residuos Cys: (i) cistibióticos o bacteriocinas con uno o más puentes disulfuro (por ej.: PedPA-1/pediocina AcH [PedAcH] y EntP); (ii) tiolbibióticos o bacteriocinas con un único residuo de Cys (por ej.: LciB) y (iii) bacteriocinas que carecen de residuos Cys (por ej.: LciA, LciM y LciG).

Con respecto al tamaño molecular, los lantibióticos son péptidos pequeños que contienen 19–37 aminoácidos (1,9–4,6 kDa), las bacteriocinas de la clase II poseen 37–59 residuos aminoácidos y una masa molecular inferior a 10 kDa y, por último, las bacteriocinas de la clase III presentan una masa molecular considerablemente superior a la de las anteriores (>30 kDa) (Cintas *et al.*, 2000b). La mayoría de las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (clases I y II) son catiónicas a pH 7,0 (Jack *et al.*, 1995), poseen un elevado punto isoeléctrico y contienen regiones hidrofóbicas y/o hidrofílicas en sus moléculas, lo que se correlaciona con su actividad sobre la membrana citoplasmática ya que: (i) su elevado pI les permite unirse a los fosfolípidos de carga neta negativa presentes en la membrana de las células sensibles y, por otra parte, (ii) su naturaleza antipática les permite su distribución a lo largo de la membrana (Nes *et al.*, 1996; Moll *et al.*, 1999b; Diep y Nes, 2002). Además, estas bacteriocinas son generalmente activas a pH ácido y neutro, lo que podría reflejar su adaptación a las condiciones ambientales en las que se desarrollan los microorganismos productores (Piard y Desmazeaud, 1991; Cintas, 1995). En general, estas bacteriocinas resisten la exposición a un amplio intervalo de valores de pH (3,0–9,0) (Cintas, 1995), habiéndose descrito la tolerancia a valores de pH más extremos (entre 1,0–2,0 y 10,0–11,0) de la acidocina B (Ten Brink *et al.*, 1994) y la bavaricina A (BavA) (Larsen y Nørrung, 1993). Por el contrario, existen bacteriocinas que presentan un intervalo de pH óptimo para su actividad muy estrecho, así, por ejemplo, la solubilidad de NisA disminuye considerablemente en el intervalo de pH 2,0–6,0 y se inactiva irreversiblemente a pH 7,0 (Hurst, 1981).

Otra característica común de las bacteriocinas de las bacterias lácticas es su termoestabilidad, que depende de diversos factores como, entre otros, el grado de pureza de la bacteriocina y el pH del medio (Cintas *et al.*, 2001). En este contexto, las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes libres de células (bacteriocinas no purificadas) resisten el calentamiento a 100–121°C y el autoclavado, a excepción de las bacteriocinas de la clase III (por ej.: helveticina J) y de la bacteriocina de la clase II enterocina 01 (Olasupo *et al.*, 1994). No obstante, la estabilidad térmica de las bacteriocinas parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad disminuye considerablemente (Cintas *et al.*, 2001).

II.3.4.3. ESPECTRO DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA

En condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son activas únicamente frente a otras bacterias Gram-positivas. No obstante, la amplitud del espectro de especies y cepas inhibidas depende de cada bacteriocina y del estado de las células diana, pudiendo fluctuar entre un espectro muy reducido, limitado a cepas con una estrecha relación filogenética con la cepa productora (por ej.: LciA), y un espectro relativamente amplio, que incluye microorganismos patógenos y alterantes presentes en los alimentos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens* (por ej.: enterocina L50 [L50A y L50B], NisA y PedPA-1). Además, las concentraciones mínimas inhibitorias para las células vegetativas y las esporas varían ostensiblemente dependiendo de la cepa productora, el tipo de muestra y las condiciones del ensayo de actividad antimicrobiana (Blom *et al.*, 1997).

En general, pueden realizarse las siguientes observaciones con respecto a la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de pequeño tamaño molecular (clases I y II) (Jack *et al.*, 1995): (i)

dentro de una misma especie pueden existir cepas sensibles y resistentes a una bacteriocina determinada, (ii) dentro de una población de células sensibles a una bacteriocina pueden existir células resistentes, (iii) una cepa sensible a una bacteriocina puede ser resistente a otra bacteriocina similar, (iv) las cepas productoras de bacteriocina(s) pueden ser sensibles a otras bacteriocinas, incluso similares a la que producen, (v) las células vegetativas de una cepa cuyos esporos bacterianos sean resistentes a una bacteriocina pueden ser sensibles a esa misma bacteriocina y (vi) en condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas no son activas frente a las bacterias Gram-negativas, a excepción de ciertas bacteriocinas (Lauková *et al.*, 1993; Simonetta *et al.*, 1997; Jennes *et al.*, 2000; Kang y Lee, 2005; Todorov *et al.*, 2005; Todorov y Dicks, 2005; Yoon *et al.*, 2005; de Kwaadsteniet *et al.*, 2006; Martín-Platero *et al.*, 2006; Sparo *et al.*, 2006), entre las que destaca EntAS-48 que es activa frente a *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Gálvez *et al.*, 1989), ni frente a virus, a excepción de ciertas bacteriocinas (sección II.2.2.4.2). A este respecto, la estructura y composición de las membranas de las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras impiden el acceso de las bacteriocinas a su lugar de actuación (membrana citoplasmática). No obstante, a pesar de que, generalmente, estos microorganismos no resultan afectados por las bacteriocinas de las bacterias lácticas en condiciones fisiológicas, éstos pueden sensibilizarse mediante tratamientos subletales que alteran la permeabilidad de su pared celular, entre los que se incluyen la exposición a diversos agentes químicos (por ej.: ácidos orgánicos y EDTA) y condiciones ambientales estresantes (por ej.: pH, congelación, tratamiento térmico suave y presión hidrostática elevada) (Kalchayanand *et al.*, 1992; Helander *et al.*, 1997; Kalchayanand *et al.*, 1998; Garriga *et al.*, 2000; de Vuyst y Leroy, 2007).

En función de su espectro de acción antimicrobiana, Jack *et al.* (1995) clasificaron las bacteriocinas en tres grupos: (i) bacteriocinas con espectro de acción reducido, únicamente activas frente a cepas de la misma especie que la del microorganismo productor (por ej.: LciA) o a otras especies de su mismo género (por ej.: amilovorina L471); (ii) bacteriocinas con espectro de acción intermedio, que inhiben, además, a otros géneros de bacterias lácticas distintos al del microorganismo productor y a otras bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. y/o *Clostridium* spp. (por ej.: Ltn481 y plantaricinas S [PltS] y T [PltT]) y (iii) bacteriocinas con un amplio espectro de acción, activas frente a un gran número de bacterias Gram-positivas, entre las que se incluyen, además de las mencionadas anteriormente, especies de los géneros *Bacillus*, *Brochotrix* y/o *Propionibacterium*. Dentro de este grupo se incluyen la enterocina L50 (EntL50 [EntL50A y EntL50B]), leucocina S (LeuS), PedPA-1, NisA y NisZ, que inhiben también la germinación de los esporos de *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp.

Por otra parte, conviene destacar que existe una fuerte correlación entre el espectro de acción antimicrobiana y la presencia de un enlace disulfuro extra en las bacteriocinas de la clase IIa (Eijsink *et al.*, 1998; Nes y Holo, 2000; Richard *et al.*, 2006).

II.3.4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son generalmente metabolitos primarios (de Vuyst *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1996; Parente *et al.*, 1997; Krier *et al.*, 1998; Lejeune *et al.*, 1998; Leroy y de Vuyst,

1999; Aymerich *et al.*, 2000b; Messens *et al.*, 2003), por lo que, en principio, puede lograrse una mejora de su producción mediante la optimización de las condiciones de crecimiento del microorganismo productor, lo que incluye diversos factores relacionados con la composición del medio (por ej.: fuente de carbohidratos y nitrógeno) y con las condiciones de fermentación (por ej.: pH, temperatura, tiempo de incubación, aireación, agitación y tamaño del inóculo) (Lejeune *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999; Leroy y de Vuyst, 2002; Leroy *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007; Nes *et al.*, 2007). No obstante, en ciertas ocasiones, pequeñas diferencias de crecimiento debidas a modificaciones en las condiciones ambientales (pH, temperatura y concentración de glucosa) provocan variaciones considerables en la producción de algunas bacteriocinas (Casaus, 1998; Krier *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999). Por otra parte, debido a las complejas interacciones que tienen lugar entre los múltiples factores que afectan a la producción de las bacteriocinas y/o a su inactivación, en ocasiones, las condiciones óptimas para el crecimiento de una cepa bacteriocinogénica difieren de las óptimas para la producción de su(s) bacteriocina(s) (de Vuyst *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997; Parente y Ricciardi, 1999; Aasen *et al.*, 2000; Møretro *et al.*, 2000; Leroy y de Vuyst, 2002, 2005). En este sentido, las condiciones de estrés ambiental, a pesar de provocar una reducción en la tasa de crecimiento del microorganismo, suelen estimular la producción de bacteriocinas (de Vuyst *et al.*, 1996; Uguen *et al.*, 1999; Neysens *et al.*, 2003; van den Berghe *et al.*, 2006), ya que se ha observado frecuentemente que: (i) el pH óptimo para la producción de bacteriocinas es ligeramente inferior al óptimo para el crecimiento del microorganismo productor (Krier *et al.*, 1998) y (ii) el estrés térmico y el cultivo del microorganismo a temperaturas subóptimas de crecimiento provocan un incremento en el rendimiento de la producción de bacteriocinas (Lejeune *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999). Asimismo, se ha descrito la producción regulada de algunas bacteriocinas por sistemas de transducción de señal (sección II.3.4.7.4), por lo que, entre otros factores, las condiciones de cultivo (por ej.: pH) podrían actuar a través de este mecanismo controlando su producción (Herranz, 2001).

II.3.4.5. PURIFICACIÓN

Debido al potencial de las bacteriocinas de las bacterias lácticas como bioconservantes de los alimentos en forma de aditivos (sección II.3.4.10), se han desarrollado diversos protocolos de purificación con el fin de mejorar los rendimientos de bacteriocinas purificadas (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Berjeaud y Cenatiempo, 2004; Saavedra *et al.*, 2004a; Beaulieu *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007), no obstante, antes de proceder a la purificación a homogeneidad de las bacteriocinas, es recomendable optimizar su producción (sección II.3.4.4), y si es posible, se debería realizar empleando fermentadores para garantizar que los parámetros claves se mantengan estables durante el tiempo de incubación (Parente y Ricciardi, 1999). En cualquier caso, dado que las bacteriocinas son péptidos que se secretan al medio extracelular, la mayoría de los protocolos de purificación se inician con una etapa de concentración de las sustancias de naturaleza proteica presentes en los sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de los cultivos de los microorganismos productores, con el objetivo de reducir el volumen de la muestra. Esta etapa inicial de concentración puede realizarse mediante: (i) precipitación de las proteínas con sales (por ej.: sulfato amónico) o con ácidos (por ej.: ácido siálico); (ii) extracción de las proteínas con solventes orgánicos (por ej.: etanol y butanol); (iii) adsorción

dependiente del pH de las bacteriocinas a los restos de las células productoras obtenidos por tratamiento térmico y a otros sustratos; (iv) filtración por diálisis o ultrafiltración; (v) desecación al vacío o (vi) liofilización (Coventry *et al.*, 1996; Carolissen-Mackay *et al.*, 1997; Venema *et al.*, 1997; Janes *et al.*, 1998; Parente y Ricciardi, 1999; Cintas *et al.*, 2001). A continuación, el empleo de diversas técnicas bioquímicas y biofísicas, seleccionadas con base en las propiedades físico-químicas de las bacteriocinas, permite su separación del resto de compuestos proteicos y, por lo tanto, su purificación a homogeneidad. Hasta la fecha, se han descrito numerosas técnicas de purificación que, generalmente, incluyen diversas etapas cromatográficas (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Carolissen-MacKay *et al.*, 1997; Parente y Ricciardi, 1999; Guyonnet *et al.*, 2000; Uteng *et al.*, 2003; Berjeaud y Cenatiempo, 2004; Saavedra *et al.*, 2004a; Beaulieu *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007), si bien, en algunas ocasiones, las etapas cromatográficas han sido sustituidas por etapas de enfoque isoeléctrico (Venema *et al.*, 1997).

Hasta la fecha, el protocolo de purificación de bacteriocinas que mayor difusión ha alcanzado en el campo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se basa en el pequeño tamaño molecular, la naturaleza catiónica y la relativa hidrofobicidad de las bacteriocinas (Nissen-Meyer *et al.*, 1992). Este protocolo incluye: (i) el desarrollo de la cepa bacteriocinogénica en un medio líquido bajo condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas, (ii) la obtención del correspondiente sobrenadante libre de células, (iii) la precipitación de las proteínas mediante adición de sulfato amónico y, por último, (iv) diversas etapas cromatográficas, entre las que incluyen las cromatografías de intercambio iónico (aniónico o catiónico), interacción hidrofóbica y fase inversa en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*). A este respecto, algunos autores describieron una variante de este protocolo que incluye una etapa cromatográfica de filtración en geles previa al intercambio catiónico (Cintas, 1995; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997, 1998a; Herranz *et al.*, 2001d). Alternativamente, se han desarrollado métodos basados en la capacidad de ciertas bacteriocinas de adsorberse a las membranas externas de las células productoras y, en general, a células de bacterias Gram-positivas inactivadas por calor (Yang *et al.*, 1992). A este respecto, esta metodología implica el ajuste del pH de los cultivos al valor (alrededor de 6) en el que se produzca la máxima adsorción de moléculas de bacteriocina. Así pues, este protocolo incluye: (i) el crecimiento de la cepa productora en un medio líquido bajo condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas, (ii) la pasteurización del cultivo para destruir las células y el ajuste de su pH a 6, (iii) la centrifugación del cultivo, (iv) la resuspensión de las células en tampón salino a pH 2, (v) la incubación de la suspensión celular a 4°C y (vi) su posterior diálisis, concentración por liofilización y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Asimismo, Venema *et al.* (1997) desarrollaron un protocolo para la purificación de PedPA-1, que incluye sólo tres pasos: (i) precipitación de las proteínas de los sobrenadantes libres de células mediante adición de etanol preenfriado, (ii) isoelectroenfoque y (iii) ultrafiltración. Aunque este método evita el empleo de técnicas cromatográficas, la eficacia del proceso no resulta mejorada.

Tras la purificación a homogeneidad de una bacteriocina, se suele proceder a la determinación de su peso molecular por espectrometría de masas y de su composición y secuencia aminoacídica. Sin

embargo, ciertas bacteriocinas poseen aminoácidos modificados que pueden originar el bloqueo de la reacción de secuenciación. En algunos casos, se puede obtener una secuenciación parcial mediante digestión con bromuro de cianógeno u otros agentes químicos. En estas situaciones, la identificación de la bacteriocina se puede conseguir mediante genética inversa, es decir, mediante la secuenciación del gen estructural de la bacteriocina y la deducción de la secuencia aminoacídica a partir de la nucleotídica (Martínez *et al.*, 2000c).

Finalmente, conviene destacar que los rendimientos obtenidos con los distintos protocolos de purificación han sido generalmente bajos e inviables para la obtención a gran escala de bacteriocina purificada, lo que ha motivado la búsqueda continua de protocolos más eficaces. En este contexto, diversos autores han generado anticuerpos específicos frente a diversas bacteriocinas (sección II.3.4.9.3.1) y han desarrollado protocolos de purificación, a partir de los sobrenadantes de las células productoras, en un sólo paso mediante cromatografía de inmunoafinidad (Suárez *et al.*, 1997; Martínez, 2000; Rose *et al.*, 2001; Benech *et al.*, 2002b; Gutiérrez *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2004a; Gutiérrez, 2005). Asimismo, se ha descrito la inmunopurificación de NisA empleando partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos (Prioult *et al.*, 2000). En este sentido, las técnicas de inmunopurificación presentan algunas ventajas sobre los métodos tradicionales multicromatográficos, como son su sencillez y su rendimiento superior (Gutiérrez, 2005).

II.3.4.6. MODO DE ACCIÓN

Las bacteriocinas pueden ejercer un modo de acción bactericida (provocando la muerte celular) o bacteriostático (inhibiendo el crecimiento celular) sobre las células sensibles, lo que depende de diversos factores tales como la dosis y el grado de purificación de la bacteriocina, el estado fisiológico de las células sensibles (fase de crecimiento) y las condiciones experimentales del ensayo (por ej.: temperatura, pH y presencia de compuestos antimicrobianos y de otros agentes que alteran la integridad de la pared celular) (Cintas *et al.*, 2001). La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas descritas hasta la fecha ejercen un modo de acción bactericida frente a los microorganismos sensibles, si bien algunas de ellas (por ej.: lactocina 27, leucocina A-UAL187 y LeuS) poseen un modo de acción bacteriostático (Cintas *et al.*, 2001).

De forma general, la acción antimicrobiana de las bacteriocinas (clases Ia y II) se debe a la desestabilización funcional de las membranas citoplasmáticas de las células sensibles (Jack *et al.*, 1995), mediante la formación de poros transitorios o de canales iónicos en la membrana (Abee, 1995). Este proceso de desestabilización de las membranas se desarrolla en tres etapas básicas: (i) unión de la bacteriocina a la membrana, (ii) inserción en la misma y (iii) formación de poros y muerte celular (Abee, 1995; Hauge *et al.*, 1998; Montville y Chen, 1998; Moll *et al.*, 1999b). La unión inicial de las bacteriocinas a las membranas citoplasmáticas está gobernada por interacciones electrostáticas entre sus residuos cargados positivamente y los grupos negativos de los fosfolípidos de las membranas (ácidos teicoicos, lipoteicoicos y teicurónicos), es decir, las regiones de las bacteriocinas que determinan su especificidad deben reconocer e interaccionar de una forma específica con entidades localizadas en las membranas de las células diana (Abee *et al.*, 1995; Driessen *et al.*, 1995; Jack *et al.*,

1995; Chen *et al.*, 1997a, b, 1998). No obstante, en el caso de las bacteriocinas de amplio espectro, parece más probable que sea un componente determinado de la membrana, y no un receptor como tal, el que reaccione con la región de la bacteriocina que determina su especificidad (Fimland *et al.*, 1998; Herranz, 2001). A este respecto, se conoce que algunos lantibióticos (con actividad formadora de poros) interaccionan con el lípido II unido a la membrana citoplasmática (precursor de la síntesis del peptidoglicano), que actúa facilitando la interacción de éstos con las membranas de las células sensibles (diana celular), es decir, como molécula “*docking*” (Brötz *et al.*, 1998; Héchard y Sahl, 2002; Hoffmann *et al.*, 2002; Bauer y Dicks, 2005; Christ *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). Asimismo, se ha sugerido que una de las subunidades del sistema fosfotransferasa (PTS, del inglés *PhosphoTransferase System*) manosa-específico ($\text{EII}_t^{\text{Man}}$) puede actuar como receptor o molécula “*docking*” de las bacteriocinas de la subclase IIa, ya que este sistema debe ser expresado para que las células sean sensibles a estas bacteriocinas (sección II.3.4.8) (Ramnath *et al.*, 2000; Dalet *et al.*, 2001; Héchard *et al.*, 2001; Ramnath *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005a; Drider *et al.*, 2006). No obstante, la existencia de un receptor proteico específico para las bacteriocinas es una cuestión controvertida (Herranz, 2001). En este sentido, por una parte, el hecho de que no todas las células sean sensibles a todas las bacteriocinas sugiere la existencia de alguna característica que determine su especificidad, ya sean moléculas de la superficie celular (ácidos lipoteicoicos), una composición de fosfolípidos y/o una organización proteica determinada, o verdaderos receptores proteicos que medien un proceso de reconocimientos molecular específico (Moll *et al.*, 1996; Gallagher *et al.*, 1997; Hauge *et al.*, 1998). No obstante, por otra parte, la existencia de bacteriocinas capaces de actuar en sistemas liposomales pone en duda la necesidad absoluta de un receptor proteico o de determinados componentes de la superficie celular para la actividad de las bacteriocinas (Chen *et al.*, 1997a; Marciset *et al.*, 1997).

Estudios realizados sobre membranas y transporte activo, así como otros basados en el análisis de la secuencia aminoacídica de varias bacteriocinas (Gallagher *et al.*, 1997; Hauge *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999), han demostrado que el mecanismo primario de estos péptidos antimicrobianos consiste en la formación de poros transitorios y complejos o canales iónicos en la membrana citoplasmática (Abee *et al.*, 1995). Actualmente, existen dos grandes modelos que explican el mecanismo por el que las bacteriocinas generan poros en las membranas citoplasmáticas (Fig. 2.3): (i) el modelo de “cuña”, aplicable a NisA y otros lantibióticos, según el cual las moléculas de bacteriocina se sitúan de forma paralela a la membrana, agregan y, posteriormente, se insertan en la membrana formando un poro (Abee, 1995; Driessen *et al.*, 1995; Moll *et al.*, 1999b) y (ii) el modelo “duela de barril”, aplicable a diversas bacteriocinas de la clase II, según el cual las bacteriocinas se integran en la membrana como monómeros y, luego, agregan estableciendo estructuras con forma de barril, en las que las caras hidrofílicas se dirigen hacia la luz del poro, mientras que las caras hidrofóbicas interaccionan con el núcleo hidrofóbico de la membrana (Abee, 1995; Ojcius y Young, 1991; Moll *et al.*, 1999b). En cualquier caso, la formación de poros origina un flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, aminoácidos y ATP) que conduce a la disipación del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y/o del gradiente de pH (ΔpH), ambos componentes de la fuerza protón-motriz (PMF, del inglés *Proton Motive Force*) (Montville y Bruno, 1994; Moll *et al.*, 1999b). La alteración o colapso de la PMF (gradiente

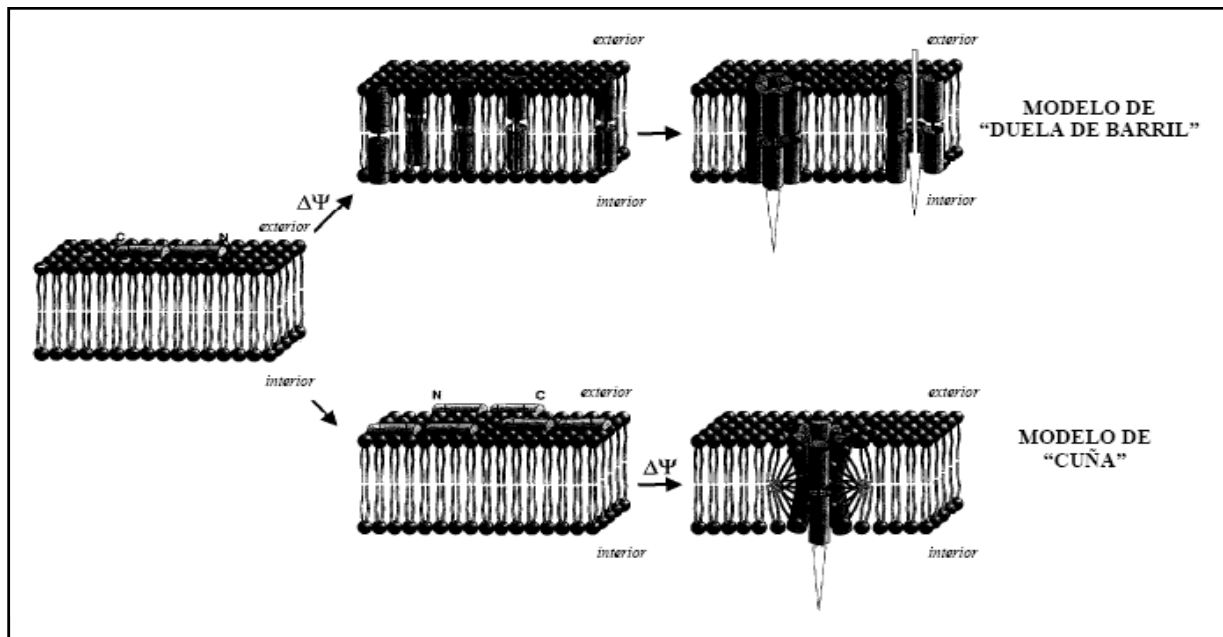


Figura 2.3. Modelos que explican la formación de poros por las bacteriocinas. Adaptado de Abee (1995).

electroquímico transmembrana necesario para el desarrollo de los procesos metabólicos dependientes de energía) provoca una reducción significativa del contenido de ATP intracelular, que se hidroliza en un intento vano de reestablecer los gradientes iónicos disipados, por lo que se impide el transporte activo de nutrientes y el mantenimiento de concentraciones adecuadas de ciertos iones (H^+ , Na^+ , K^+ y Mg^{2+}) y se reduce la síntesis de macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos), lo que conduce al cese del crecimiento bacteriano y, en última instancia, origina la muerte celular (Moll *et al.*, 1999b; Herranz, 2001). Finalmente, la actividad bactericida de las bacteriocinas puede ir acompañada de la lisis de las células sensibles (bacteriocinas bactericidas bacteriolíticas) (por ej.: NisA, plantaricina C y enterococcina EFS2) que se produce como consecuencia de la entrada masiva de agua y el consiguiente choque osmótico (Ojcius y Young, 1991) o de la activación de enzimas autolíticas asociados a la pared celular bacteriana (Jack *et al.*, 1995; Martínez-Cuesta *et al.*, 2000). No obstante, la acción bactericida de las bacteriocinas (bacteriocinas bactericidas no bacteriolíticas) generalmente no causa lisis celular (por ej.: enterocinas A, B y 226 NWC, LciA y sakacina P [SakP]) (Schillinger y Lücke, 1989; van Belkum *et al.*, 1991; Franz *et al.*, 1996, 1999b; Cintas *et al.*, 2001).

Por otra parte, conviene destacar que existen bacteriocinas (producidas por bacterias Gram-positivas) con modos de acción diferentes a la formación de poros (Héchar y Sahl, 2002; Hoffmann *et al.*, 2002; Pag y Sahl, 2002b; Bauer y Dicks, 2005; Cotter *et al.*, 2005b), entre los que destacan: (i) la inhibición de la biosíntesis de la pared celular por algunos lantibióticos (por ej.: NisA, mersacidina y actagardina) (Fig.2.4), estando implicado el lípido II unido a la membrana como molécula “docking”; (ii) la inhibición de la actividad de enzimas importantes, tales como la fosfolipasa A2 y la enzima convertidora de angiotensina (ACE) por algunos lantibióticos globulares (Ib) (por ej.: ancovenina, cinamicina y duramicina); (iii) la inhibición de la formación de septos durante la división de células bacterianas sensibles a la lactococcina 972 [Lci972] y (iv) la hidrólisis de la pared celular por las bacteriocinas de la clase III (por ej.: EnlA) (Fig.2.4), que provoca la lisis de las células sensibles.

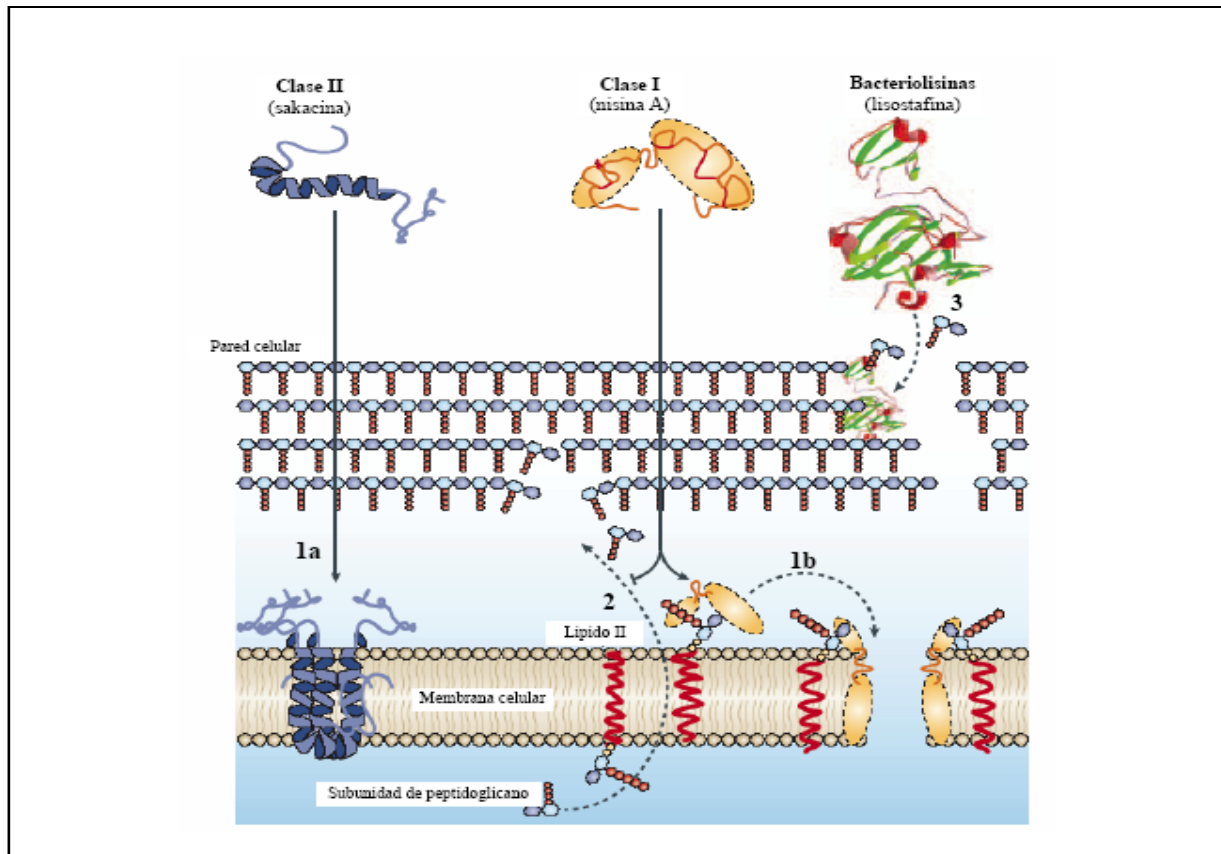


Figura 2.4. Principales modos de acción propuestos para las bacteriocinas: (i) formación de poros en la membrana, mediada o no por una molécula *docking* (1a y 1b, respectivamente); (ii) inhibición de la síntesis de la pared celular (2) e (iii) hidrólisis de la pared celular (3). Adaptado de Cotter et al. (2005b).

II.3.4.7. ORGANIZACIÓN GENÉTICA Y BIOSÍNTESIS

Los determinantes genéticos asociados a la síntesis de las bacteriocinas forman agrupaciones génicas (*clusters*) compuestas por varios genes agrupados en uno, dos o, incluso, tres operones. Estas agrupaciones génicas (Fig. 2.5) constan generalmente de: (i) un gen que codifica la preprobacteriocina (gen estructural); (ii) un gen que codifica la proteína de inmunidad que protege a la célula productora de la toxicidad de la bacteriocina (gen de inmunidad); (iii) los genes responsables del procesamiento y transporte de la preprobacteriocina, que en el caso de transportadores del tipo ABC (sección II.5.1.1) requieren otro gen (gen de la proteína accesoria) que codifica una proteína accesoria esencial para la función de estos transportadores y, en algunos casos; (iv) los genes que codifican enzimas responsables de las modificaciones postraduccionales de la probacteriocina (genes de modificación); y (v) genes que codifican componentes involucrados en la regulación de la biosíntesis de la preprobacteriocina (genes de regulación) (Nes *et al.*, 1996; Sablon *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002; Pag y Sahl, 2002a, b; Chen y Hoover, 2003; Skaugen *et al.*, 2003).

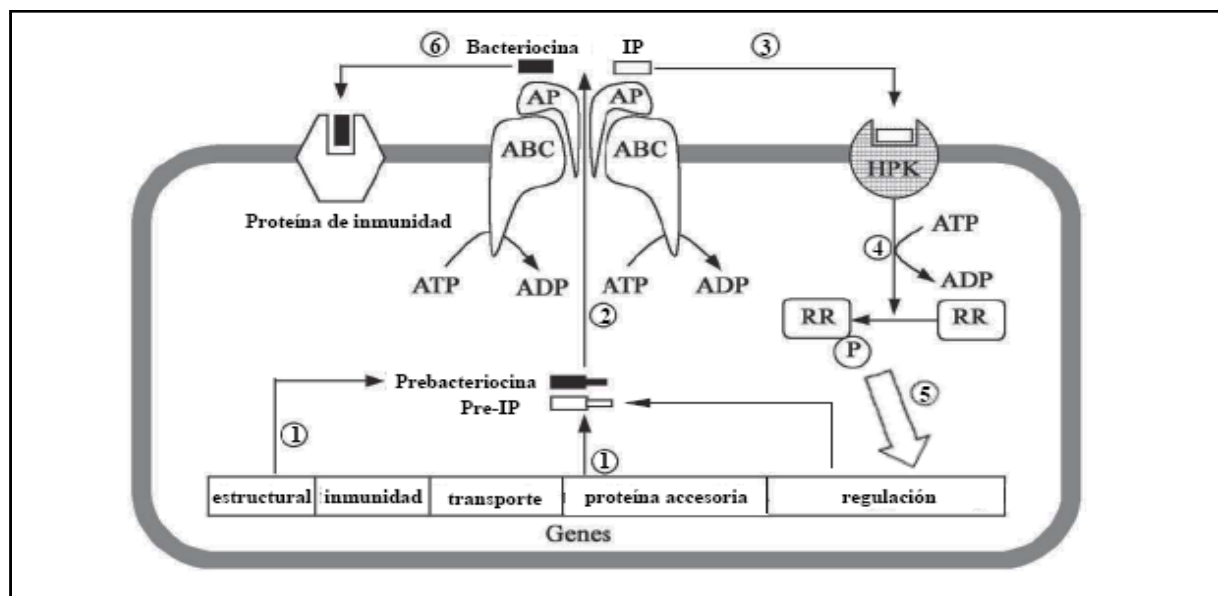


Figura 2.5. Representación esquemática de las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas de la clase II. ABC, transportador del tipo ABC; AP, proteína accesoria del transportador del tipo ABC; HPK, proteína histidina-quinasa; IP, péptido inductor; RR, proteína reguladora de respuesta. *Adaptado de Chen y Hoover (2003).*

En lo que se refiere a su localización, las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de las bacteriocinas pueden localizarse en plásmidos, en el cromosoma o, incluso, en transposones (Jack *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 2001; Diep y Nes, 2002). En este contexto, en cepas productoras de múltiples bacteriocinas, los genes implicados en su síntesis pueden localizarse: (i) en un único plásmido, como es el caso de LciA, LciB y LciM de *Lc. lactis* subesp. *cremoris* 9B4, codificadas en el plásmido p9B4-6 (van Belkum *et al.*, 1992); (ii) en el cromosoma, como es el caso de las plantaricinas N (PltN), EF (PltEF) y JK (PltJK) producidas por *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1996; Diep y Nes, 2002) o (iii) en el cromosoma y en plásmidos diferentes, como es el caso de: EntL50, EntP y EntQ, producidas por *E. faecium* L50, codificadas en los plásmidos pCIZ1 (50 kb aprox.), pCIZ2 (7,4 kb) y en el cromosoma, respectivamente (Cintas *et al.*, 1998a; Criado *et al.*, 2006a); y carnobacteriocinas BM1 (CbnBM1), B2 (CbnB2) y CbnA producidas por *Carnobacterium piscicola* LV17, codificadas en el cromosoma y en los plásmidos pCP49 (72 kb) y pCP40 (61 kb), respectivamente (Quadri *et al.*, 1994; Worobo *et al.*, 1994; Quadri *et al.*, 1995, 1997b). Por otra parte, conviene destacar que la localización de los genes que codifican una bacteriocina puede variar según la cepa productora, como se ha descrito para algunas bacteriocinas (SakP, EntL50 [EntL50A y EntL50B] y EntAS-48) (Moreno *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2003; Abriouel *et al.*, 2005).

II.3.4.7.1. Gen(es) estructural(es)

La mayoría de los genes estructurales de las bacteriocinas de las bacterias lácticas codifican precursores biológicamente inactivos (prebacteriocinas) que contienen: (i) una extensión N-terminal y (ii) un propéptido C-terminal (probacteriocina), que dará lugar a la bacteriocina madura (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001). Las extensiones N-terminales pueden ser: (i) secuencias líder del tipo “doble glicina” (Gly-Gly) (15–30 aa), reconocidas por los sistemas de transporte del tipo

ABC (sección II.5.1.1), que presentan homología en sus estructuras primarias y contienen residuos hidrofóbicos en posiciones -4, -7, -12 y -15 (con respecto al punto de procesamiento de la prepro bacteriocina), residuos hidrofílicos en posiciones -8, -9, -11 y un residuo Gly totalmente conservado en posición -2, aunque, generalmente, se caracterizan por la presencia de dos residuos Gly conservados en su extremo C-terminal (posiciones -1 y -2) (Håvarstein *et al.*, 1994, 1995; Casaus, 1998; Herranz, 2001); (ii) secuencias líder del tipo FNLDV o tipo nisina (23–30 aa), reconocidas también por los sistemas de transporte del tipo ABC (sección II.5.1.1), que presentan el motivo conservado FNLDV, un residuo Ser en posición -6 (con respecto al punto de procesamiento de la prepro bacteriocina) y un residuo de prolina (Pro) en posición -2 (Nes y Johnsborg, 2004; de Jong *et al.*, 2006) o (iii) péptidos señales (SP, del inglés *Signal Peptide*) (18–30 aa), que permiten el procesamiento y la secreción de bacteriocinas por el sistema Sec (sección II.5.1.2), sin homología en sus estructuras primarias, pero caracterizados por la presencia de un dominio N (compuesto por 1–5 aa y con carga neta positiva), un dominio H (compuesto por 7–15 aa y con naturaleza hidrofóbica) y un dominio C (compuesto por 3–7 aa y con carga neta positiva) (Casaus, 1998; Fekkes y Driessen, 1999; Cintas *et al.*, 2001; Herranz, 2001). De forma general, las extensiones desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento, procesamiento (eliminación de la extensión N-terminal) y la secreción al medio extracelular de las bacteriocinas (sección II.5.1). Asimismo, se ha sugerido que las extensiones N-terminales: (i) podrían intervenir en la modificación postraduccional de ciertos lantibióticos (Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003) y (ii) mantienen las bacteriocinas biológicamente inactivas en el interior de la célula productora, protegiéndola de sus efectos tóxicos mientras permanecen en su interior (Jack *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1996), si bien se ha descrito que el precursor de PedAcH/PedPA-1 posee actividad antimicrobiana (Ray *et al.*, 1999). En este contexto, conviene destacar que, a pesar de que la práctica totalidad de las bacteriocinas de las bacterias Gram-positivas se sintetizan en forma de precursores inactivos, algunas bacteriocinas se sintetizan sin ningún tipo de extensión N-terminal, como es el caso de EntL50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a), EntQ (Cintas *et al.*, 2000d), enterocina EJ97 (EntEJ97) (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003), enterocina MR10 (EntMR10 [EntMR10A y EntMR10B]) (Martín-Platero *et al.*, 2006), bacteriocina LsbB (Gajic *et al.*, 2003), aureocina A70 (AurA70 [AurA, AurB, AurC y AurD]) (Netz *et al.*, 2001) y aureocina A53 (Netz *et al.*, 2002), siendo su mecanismo de secreción desconocido hasta la fecha, salvo en el caso de las bacteriocinas LsbB, EntEJ97 y EntQ. Finalmente, las bacteriocinas pertenecientes a la subclase IIb (sistema de dos péptidos) (por ej.: EntL50 [EntL50A y EntL50B]) contienen dos genes estructurales contiguos.

II.3.4.7.2. Gen(es) de inmunidad

En la mayoría de los bacteriocinas, el gen que codifica la proteína de inmunidad se localiza en el mismo operón que el gen estructural, de forma contigua y con idéntica orientación, de manera que la proteína de inmunidad específica se expresa concomitantemente con la bacteriocina, pero, a diferencia de ésta, no requiere un sistema de procesamiento y transporte ya que no se secreta al medio extracelular (Nes *et al.*, 1996). No obstante, en ocasiones, los genes de inmunidad tienen una localización atípica, como ocurre en las agrupaciones génicas de: (i) la bacteriocina LsbB de *Lc. lactis* BGM1 (Gajic *et al.*,

2003), EntB de *E. faecium* BFE 900 (Franz *et al.*, 1999b) y CbnA de *C. piscicola* LV17A (Franz *et al.*, 2000), en las que se encuentran situados próximos al gen estructural pero con orientación contraria y (ii) la munditocina KS de *E. mundtii* NFRI 7393 (Kawamoto *et al.*, 2002), en la que los genes estructural, de transporte y de inmunidad, contiguos y con la misma orientación, se encuentran situados en un único operón, si bien el gen de transporte se encuentra situado entre el gen estructural y el de inmunidad.

De forma general, las proteínas de inmunidad se caracterizan por su pequeño tamaño molecular (51–154 aa) y su elevado pI (7–10), así como por la presencia de posibles segmentos hidrofóbicos transmembrana, lo que sugiere que podrían integrarse en las membranas citoplasmáticas de las células productoras de bacteriocinas para ejercer su acción protectora (Fremaux *et al.*, 1993; Diep *et al.*, 1996). Recientemente, se ha demostrado que la estructura tridimensional de las proteínas de inmunidad de CbnB2 y enterocina A (EntA) es muy similar, a pesar de conferir resistencia a bacteriocinas con secuencias aminoácidas muy diferentes, ya que ambas presentan cuatro hélices α (Sprules *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005b; Drider *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo molecular de acción de las proteínas de inmunidad aún no se ha elucidado (Fimland *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2004; Fimland *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006). Abee (1995) sugirió que estas proteínas podrían interaccionar con las bacteriocinas en el medio extracelular para impedir su interacción con las membranas y la consiguiente formación de poros. No obstante, esta hipótesis se descartó tras demostrarse que: (i) las proteínas de inmunidad de LciA (Venema *et al.*, 1994) y CbnB2 (Quadri *et al.*, 1995) no son activas desde el exterior celular y (ii) la localización de la proteína de inmunidad de la mesentericina Y105 (MesY105) es intracelular (Johnsen *et al.*, 2004). El modelo propuesto por Abee (1995) también sugiere que la proteína de inmunidad podría interaccionar con las moléculas de bacteriocina integrantes de los poros de membrana, desestabilizándolos y/o sellándolos. No obstante, resulta poco probable que exista una interacción directa entre la bacteriocina y su proteína de inmunidad, ya que la homología entre las proteínas de inmunidad de bacteriocinas estrechamente relacionadas es escasa (Nes *et al.*, 1996; Fimland *et al.*, 2002). Por otra parte, el modelo propuesto por Venema *et al.* (1994) para la proteína de inmunidad de LciA sugiere que ésta podría interaccionar, a través de su segmento transmembrana, con una proteína transmembrana que actuara como receptor de la bacteriocina, lo que dificultaría su inserción en la membrana y, por lo tanto, su acción antimicrobiana. Posteriormente, otros autores también han sugerido que las proteínas de inmunidad actúan alterando la interacción entre la bacteriocina y el hipotético receptor de la bacteriocina localizado en la membrana (Quadri *et al.*, 1995; Sprules *et al.*, 2004). Recientemente, Johnsen *et al.* (2004, 2005a) han demostrado que la mitad C-terminal de las proteínas de inmunidad de las bacteriocinas de la clase IIa contiene una región implicada en el reconocimiento específico, directa o indirectamente, de las bacteriocinas frente a las que confiere inmunidad, concretamente de su extremo C-terminal, y que, además, las proteínas de inmunidad no interaccionan estrechamente con la membrana citoplasmática, sino que pueden estar asociadas débilmente como proteínas de membrana periféricas, lo que permitiría su interacción con las bacteriocinas. Así pues, de acuerdo con este modelo la bacteriocina y la proteína de inmunidad se sitúan en lados opuestos de la membrana celular y parece no existir contacto directo entre ambas

moléculas (Johnsen *et al.*, 2004; Fimland *et al.*, 2005; Johnsen *et al.*, 2005a; Drider *et al.*, 2006). Además, puesto que existe cierta variación (dependiente de la cepa bacteriana) en la funcionalidad de las proteínas de inmunidad (Fimland *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2004), se ha sugerido que estas proteínas podrían interaccionar indirectamente con las bacteriocinas a través de componentes celulares (por ej.: el hipotético receptor de las bacteriocinas) que variaran, en cierto modo, en las distintas cepas (Fimland *et al.*, 2005; Johnsen *et al.*, 2005a).

Adicionalmente, algunos transportadores del tipo ABC (sección II.5.1.1) están implicados en la inmunidad frente a bacteriocinas mediante la extrusión activa de las moléculas que han conseguido penetrar en la membrana desde el medio extracelular, lo que evita su acumulación en la membrana (Young y Holland, 1999; Stein *et al.*, 2005). Este mecanismo de inmunidad se ha descrito en la mayoría de los lantibióticos, salvo en el caso de los lantibióticos Pep5, epicidina 280, Cyl y lactocina S (Skaugen *et al.*, 2003), y puede constituir el único mecanismo de inmunidad presente, tal es el caso de Ltn481 (Rincé *et al.*, 1997), o un mecanismo de inmunidad adicional al de la típica proteína de inmunidad, como ocurre en el caso de NisA (Siezen *et al.*, 1996) y la subtilina (Klein y Entian, 1994). Por consiguiente, en estos sistemas existen dos transportadores del tipo ABC, uno implicado en la secreción del precursor del lantibiótico y el otro en la inmunidad frente a su forma madura. A este respecto, conviene destacar que no existen homologías entre ambos transportadores y que, además, su configuración es diferente, ya que en el transportador del tipo ABC implicado en la secreción, sus dos dominios forman parte de un único polipéptido, mientras que en el transportador del tipo ABC implicado en la inmunidad cada dominio se sintetiza de manera independiente (Young y Holland, 1999). Por otra parte, también se han descrito transportadores del tipo ABC implicados en la inmunidad frente a algunas bacteriocinas de la clase II, como ocurre en el caso de EntAS-48 (Díaz *et al.*, 2003), CirA (Kemperman *et al.*, 2003) y bacteriocinas LsbA y LsbB (Gajic *et al.*, 2003). Es interesante destacar el caso especial de las bacteriocinas LsbA y LsbB, en el que LmrB es un transportador MDR del tipo ABC con función dual, responsable tanto del transporte como de la inmunidad de la bacteriocina LsbA (sintetizada con secuencia líder) y de la bacteriocina LsbB (sintetizada sin extensión N-terminal) (Gajic *et al.*, 2003). De forma similar, es probable que el transportador ABC EntL50GHIIJ de *E. faecium* L50 ejerza una función dual, estando implicado en la secreción de EntL50 (EntL50A y EntL50B) e inmunidad frente a esta bacteriocina (Criado, 2006).

II.3.4.7.3. Genes de procesamiento y transporte

El transporte y procesamiento de las bacteriocinas que se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder doble glicina depende de la coexpresión de dos genes que codifican un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, y que, generalmente, se encuentran ligados al gen estructural y al de inmunidad (Nes *et al.*, 1996). Las características de este sistema de transporte, así como las del sistema Sec, se tratan detalladamente en la sección II.5 de esta memoria.

II.3.4.7.4. Genes de regulación de la producción: sistema de transducción de señal de tres componentes

La producción de la bacteriocinas puede ser considerada como un proceso con una aparente y única función: la inhibición de la microflora que compite por un sustrato o nutriente limitado, por lo tanto, parece razonable considerar que la capacidad de producir bacteriocinas de forma regulada en función de los niveles de algun(os) factor(es) ambiental(es) puede representar una ventaja adaptativa para la cepa bacteriocinogénica favorecida por la selección natural (Skaugen *et al.*, 2003).

En numerosas ocasiones, la capacidad de producir bacteriocinas constituye un fenotipo inestable que puede perderse por diversas razones como: (i) inestabilidad plasmídica (en el caso de bacteriocinas codificadas en plásmidos); (ii) inactivación de sus genes por inserción de transposones; (iii) dilución de cultivos bacteriocinogénicos en un medio líquido por debajo de un umbral e (iv) incubación a temperaturas superiores a las máximas de producción (Diep *et al.*, 1995; Eijsink *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Nes y Eijsink, 1999; Diep *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Eijsink *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). En este sentido, se ha descrito la existencia de mecanismos moleculares involucrados en la regulación transcripcional de la producción de algunas bacteriocinas (Kleerebezem y Quadri, 2001; Quadri, 2002), como en el caso de EntA de *E. faecium* CTC492 (Nilsen *et al.*, 1998), NisA de *Lc. lactis* (Kuipers *et al.*, 1995), PltN, PltEF y PltJK de *Lb. plantarum* C11 (Diep *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998), sakacina A (SakA) de *Lactobacillus sakei* Lb706 (Axelson y Holck, 1995) y SakP de *Lb. sakei* LTH673 (Eijsink *et al.*, 1996). Así pues, la regulación de la producción de estas bacteriocinas depende de un sistema de transducción de señal, similar a los sistemas que intervienen en la regulación de la respuesta de las células bacterianas a modificaciones ambientales (Diep *et al.*, 1996; Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003), que generalmente consta de tres componentes (Fig. 2.5): (i) un péptido inductor (IP, del inglés *Inducing Peptide*), conocido también como factor de inducción, molécula señal o feromona; (ii) una proteína sensora histidina-quinasa (HPK, del inglés *Histidine Protein Kinase*), que funciona como sensor de señales específicas y (iii) una proteína reguladora de respuesta (RR, del inglés *Response Regulator*), que, tras ser activada por una proteína HPK específica, desencadena la respuesta adaptativa del hospedador (Nes *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997; Nes y Eijsink, 1999; Kleerebezem y Quadri, 2001). En lo que respecta a los genes que codifican estos componentes, conviene destacar que pueden constituir un operón independiente (por ej.: PltEF y PltJK) o bien formar parte del operón en el que se localizan los genes de transporte (por ej.: CbnB2).

II.3.4.7.4.1. Péptido inductor

Los IPs son moléculas de pequeño tamaño molecular, con o sin modificaciones postraduccionales, que constituyen la señal inicial de los sistemas reguladores de tres componentes y que controlan la biosíntesis de determinadas bacteriocinas, permitiendo su producción de manera rápida y “explosiva” mediante un mecanismo de autoinducción (Nes y Eijsink, 1999). Conviene destacar que estos péptidos presentan similitudes estructurales con las bacteriocinas (Nes y Eijsink, 1999), ya que los IPs: (i) son catiónicos, parcialmente anfipáticos y con capacidad de adoptar una estructura en hélice α y (ii) se sintetizan en forma de precursores con una secuencia líder, generalmente del tipo Gly-Gly, lo que

sugiere que los IPs y bacteriocinas podrían ser procesados y secretados por el mismo transportador del tipo ABC. No obstante, los IPs también presentan características que, claramente, los diferencian de las bacteriocinas (Nes y Eijsink, 1999; Skaugen *et al.*, 2003), como son: (i) su menor tamaño molecular (tan sólo 19–26 aa), a diferencia del tamaño superior de las bacteriocinas (>30 aa); (ii) la ausencia de actividad antimicrobiana, exceptuando el caso del IP del sistema de las plantaricinas de *Lb. plantarum* C11 (Anderssen *et al.*, 1998) y los casos en los que las propias bacteriocinas (por ej.: NisA) inducen su propia síntesis (Kuipers *et al.*, 1995) y (iii) su elevada potencia, ya que poseen actividad biológica a concentraciones (aprox., 0,1 nM) considerablemente menores que las requeridas para que las bacteriocinas ejerzan su efecto antimicrobiano (orden picomolar-nanomolar). Por otra parte, existe una homología significativa entre los IPs descritos hasta la fecha, si bien, éstos actúan, generalmente, de manera muy específica a nivel de cepa (Brurberg *et al.*, 1997; Nes y Eijsink, 1999). Asimismo, el gen que codifica el IP se cotranscribe con los genes de las proteínas HPK y RR (Nes y Eijsink, 1999). En lo que respecta a la función de los IPs, como resultado de su autoinducción se expresan además todos los genes necesarios para la producción e inmunidad de las bacteriocinas (Nes y Eijsink, 1999).

II.3.4.7.4.2. Proteína histidina-quinasa y proteína reguladora de respuesta: transducción de señal

Las HPKs de estos sistemas contienen tres dominios: (i) un dominio sensor N-terminal, localizado en el lado periplásmico de la membrana citoplasmática, que detecta la presencia del IP, (ii) un dominio central o de membrana, rico en aminoácidos hidrofóbicos que presumiblemente forman 6–8 hélices α transmembrana y (iii) un dominio C-terminal de unión al ATP (también denominado dominio transmisor), que posee actividad autoquinasa y contiene un residuo de histidina (His) conservado que constituye el lugar de fosforilación (Nes y Eijsink, 1999). Por otra parte, las RRs poseen dos dominios: (i) un dominio N-terminal, que contiene un residuo de ácido aspártico conservado que representa el lugar de fosforilación y (ii) un dominio receptor C-terminal, que media la respuesta adaptativa (Nes *et al.*, 1996).

El mecanismo de inducción de estos sistemas de transducción de señal consiste en una serie de reacciones de fosforilación y desfosforilación acopladas que se desarrollan en cinco etapas (Fig. 2.5): (i) unión del IP al dominio sensor de la HPK, (ii) autofosforilación de la HPK, (iii) desfosforilación de la HPK y fosforilación acoplada del dominio receptor de la proteína RR, (iv) interacción de la proteína RR con secuencias específicas situadas en la región promotora de los genes diana y, por último, (v) activación de la transcripción de los genes implicados en la producción de las bacteriocinas (Nes y Eijsink, 1999). A este respecto, conviene destacar que la estructura de la región promotora de los genes regulados de esta forma es atípica, ya que contienen: (i) una secuencia –10 muy conservada, (ii) una secuencia –35 poco conservada que, por lo tanto, es difícilmente reconocible como tal y (iii) dos secuencias adicionales características con las que interacciona la proteína RR, denominadas secuencias –80 y –40, que contienen secuencias repetidas directa o inversa de aprox. 10 pb y separadas entre sí por una distancia 12–13 pb (equivalente aproximadamente a dos vueltas en la cadena de ADN) (Diep *et al.*, 1996; Brurberg *et al.*, 1997; Risøen *et al.*, 1998; Nes y Eijsink, 1999; Risøen *et al.*, 2000).

Hasta la fecha, se han propuesto dos modelos para explicar el proceso de inducción de la síntesis de bacteriocinas. Según el modelo de regulación por densidad celular (del inglés *Quorum Sensing*), el IP se produce de forma constitutiva en pequeñas cantidades, acumulándose progresivamente durante el crecimiento celular, y cuando se alcanza el nivel umbral requerido para ejercer la autoinducción se incrementa la expresión de todos los genes de la agrupación génica de la bacteriocina. El modelo alternativo propone que se produce IP a un nivel ligeramente inferior al necesario para la autoinducción, y que la presencia de ciertas condiciones ambientales aumenta transitoriamente su producción, de manera que cuando se supera el nivel umbral se induce su propia síntesis y la del resto de genes de la agrupación génica de la bacteriocina (Nes *et al.*, 1996; Nes y Eijsink, 1999; Straume *et al.*, 2007).

II.3.4.8. RESISTENCIA ADQUIRIDA

De forma general, la presencia de una sustancia antimicrobiana en un ambiente determinado en el que haya bacterias provoca la selección de variedades bacterianas resistentes a esa sustancia antimicrobiana. En particular, el cultivo de bacterias en presencia de bacteriocinas puede provocar la aparición de mutantes resistentes. En este sentido, estudios realizados sobre la respuesta de varias cepas de *L. monocytogenes* a la presencia de PedPA-1 y NisA demostraron que: (i) de forma natural, existen cepas resistentes a cada una de las bacteriocinas, (ii) la influencia de los factores ambientales en la aparición de resistencias es específica de la bacteriocina, ya que las condiciones de estrés ambiental disminuyen la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a NisA, pero no influyen en la aparición de mutantes resistentes a PedPA-1, (iii) la estabilidad del fenotipo de resistencia varía considerablemente, siendo inestable en el caso de NisA, pero estable en el de PedPA-1, (iv) el coste metabólico que supone el fenotipo de resistencia, medido como una reducción en la tasa de crecimiento, también varía, siendo muy evidente en el caso de PedPA-1 y (v) las cepas mutantes resistentes no son más sensibles a las condiciones de estrés ambiental (Gravesen *et al.* 2002a; Chen y Hoover, 2003). No obstante, respecto a esta última característica, conviene mencionar que Modi *et al.* (2000) demostraron que las cepas mutantes resistentes a NisA son más sensibles a los tratamientos térmicos que las cepas salvajes.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para elucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencias a las bacteriocinas. En este sentido, la aparición de mutantes de *Listeria* spp. con bajos niveles de resistencia a bacteriocinas de la clase IIa se ha asociado con alteraciones en la composición lipídica, contenido de alanina (Ala) y carga de su membrana citoplasmática (Crandall y Montville, 1998; Vadyvaloo *et al.*, 2002; Limonet *et al.*, 2004b; Vadyvaloo *et al.*, 2004a, b; Drider *et al.*, 2006). Por otra parte, la aparición de mutantes de *L. monocytogenes* y *E. faecalis* con altos niveles de resistencias a bacteriocinas se debe principalmente a la pérdida del sistema PTS manosa-específico ($\text{EII}_t^{\text{Man}}$), codificado por el operón *mptACD*, que podría constituir la molécula “docking” de estas bacteriocinas (Dalet *et al.*, 2000, 2001; Héchard *et al.*, 2001; Gravesen *et al.*, 2002b, 2004; Ramnath *et al.*, 2004). Asimismo, la aparición de mutantes de *L. monocytogenes* con altos niveles de resistencia también es el resultado de la pérdida del factor σ^{54} , codificado por el gen *rpoN* (Robichon *et al.*, 1997),

y del activador ManR asociado a σ^{54} (Dalet *et al.*, 2001), implicados ambos componentes en la regulación positiva del operón *mpt* (Xue *et al.*, 2005). Además, en algún caso, la aparición de mutantes con altos niveles de resistencia a bacteriocinas de la clase IIa se ha asociado a la sobreexpresión del sistema PTS glucósido β -específico (EII^{Bgl}) (Gravesen *et al.*, 2000, 2002b). Por otra parte, en un estudio reciente Diep *et al.* (2007) han demostrado que la pérdida de dos componentes de EII^{t^{Man}} (*ptnC* y *ptnD*) en *Lc. lactis* IL1403, permite a esta cepa desarrollar resistencia frente a LciA debido a que actúan como dianas celulares de LciA y de diversas bacteriocinas pertenecientes a la clase II (EntP, LciB, PedPA-1 y SakA) y, por ello, se hipotetiza con la posibilidad de que las proteínas de inmunidad de estas bacteriocinas presenten un mecanismo similar para protegerse frente a sus propias bacteriocinas (Diep *et al.*, 2007).

Recientemente, el empleo de la tecnología de “*microarrays*” de ADN para la caracterización de los mecanismos de resistencia a NisA en *Lc. lactis* ha revelado variaciones en la regulación de 95 genes diferentes (Kramer, 2005; Kramer *et al.*, 2006), pertenecientes a las siguientes categorías funcionales: (i) síntesis de la pared celular, (ii) metabolismo central y energético, (iii) metabolismo de los fosfolípidos y los ácidos grasos, (iv) regulación génica, (v) transporte, (vi) respuesta a condiciones de estrés y (v) otras funciones desconocidas. Entre los genes sobreexpresados en estos mutantes destacan: (i) genes que codifican proteínas de unión a penicilinas; (ii) genes implicados en la síntesis de la pared celular, concretamente en sustituciones en el ácido lipoteicoico, cuya sobreexpresión provoca un incremento de la carga positiva de la pared celular; (iii) genes que codifican transportadores del tipo ABC (sección II.5.1.1) implicados en la resistencia a determinadas sustancias (por ej.: arsénico y bacitracina) y (iv) genes implicados en el metabolismo del nitrógeno, particularmente en el catabolismo de la arginina, cuya sobreexpresión provoca un incremento de la producción de amonio y, por lo tanto, del pH de la pared celular, lo que podría incrementar su afinidad por NisA, impidiendo su acceso a la membrana citoplasmática. Por otra parte, se observó una reducción de la expresión de los genes implicados en la saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. En definitiva, la resistencia a NisA en *Lc. lactis* y, probablemente, en otras bacterias Gram-positivas, es un rasgo multifactorial en el que están implicados simultáneamente numerosos mecanismos, que parecen ser transitorios ya que este fenotipo (resistencia) desaparece rápidamente cuando las cepas se desarrollan en un medio sin esta bacteriocina (Kok *et al.*, 2005; Kramer, 2005; Kramer *et al.*, 2006).

Es conveniente destacar que se ha observado que tras el cultivo de determinadas cepas bacterianas en presencia de algunas bacteriocinas de la clase IIa, en ocasiones, se obtienen mutantes resistentes a esa bacteriocina que también son resistentes a otras bacteriocinas de la misma clase (por ej.: PedAcH/BavA, PedAcH/piscicolina 126 [Psc126], PedPA-1/divergicina M35 y leucocinas A [LeuA], B y E/SakA), lo que sugiere la existencia de un posible mecanismo general de resistencia a las bacteriocinas de la clase IIa (Rekhif *et al.*, 1994; Dykes y Hastings, 1998; Rasch y Knøchel, 1998; Bouttefroy y Milliere, 2000; Ramnath *et al.*, 2000; Gravesen *et al.*, 2002b; Ramnath *et al.*, 2004; Naghmouchi *et al.*, 2007). Por otra parte, diversos estudios revelaron que mutantes resistentes a bacteriocinas de la clase IIa no son resistentes a los lantibióticos ni a otras bacteriocinas pertenecientes a otras clases (Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Rasch y Knøchel, 1998; Guinane *et al.*, 2006). Sin

embargo, Gravesen *et al.* (2002a) han descrito el desarrollo de resistencia simultánea frente a NisA y PedPA-1 de una cepa de *L. monocytogenes*, y diversos autores han observado la aparición de resistencias cruzadas frente a bacteriocinas de las clases I y II (Crandall y Montville, 1998; Bouttefroy y Milliere, 2000; Gravesen *et al.*, 2004; Naghmouchi *et al.*, 2007). Por todo ello, dado que uno de los problemas que plantea el empleo de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios (sección II.3.4.10) es la aparición de poblaciones resistentes, el empleo de combinaciones de bacteriocinas con una potente actividad antimicrobiana y con diferentes mecanismos de acción, en un sistema de barreras múltiples, podría evitar la aparición y el desarrollo de resistencias bacterianas (Cintas *et al.*, 2000b; Cotter *et al.*, 2005b).

II.3.4.9. MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Las técnicas empleadas en la identificación, detección y cuantificación de las bacteriocinas pueden dividirse en tres grandes grupos: (i) pruebas biológicas, basadas en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas frente a microorganismos sensibles (microorganismos indicadores); (ii) pruebas genéticas, basadas en la detección de secuencias específicas de genes estructurales de bacteriocinas ya caracterizadas y (iii) pruebas inmunoquímicas, basadas en la detección de bacteriocinas mediante el empleo de anticuerpos específicos (Martínez *et al.*, 2000c). Además, existen otras pruebas para la detección y/o cuantificación de bacteriocinas, aunque su empleo está menos generalizado, basadas en fenómenos físico-químicos como la: (i) conductancia (Giraffa *et al.*, 1990); (ii) concentración de ATP liberado al medio extracelular tras la ruptura de la membrana (Criado, 2006); (iii) quimioluminiscencia/fluorometría (Wahlström y Saris, 1999); (iv) bioluminiscencia (Reid *et al.*, 1990) y (v) espectrometría de masas (Rose *et al.*, 1999; Zendo *et al.*, 2007).

II.3.4.9.1. Pruebas biológicas

Las pruebas biológicas constituyen, habitualmente, el punto de partida en la búsqueda de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas. Los bioensayos más empleados son la prueba de difusión en agar (ADT, del inglés *Agar Diffusion Test*) (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995) y los métodos turbidométricos como la prueba en placas microtituladoras (MPA, del inglés *Microtiter Plate Assay*) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000d) basados en la inhibición del desarrollo de un microorganismo indicador inoculado en una placa de agar o en una placa microtituladora, respectivamente. La cuantificación de la actividad antimicrobiana se realiza empleando “unidades arbitrarias” (UA), en la prueba de difusión en placas de agar, o “unidades de bacteriocina” (UB), cuando el bioensayo utilizado es la prueba turbidométrica. Ambos parámetros se definen como la recíproca de la máxima dilución de la muestra analizada que: (i) inhibe al microorganismo indicador inoculado en la placa de agar produciendo la aparición de un halo o zona de inhibición del indicador (UA) o (ii) inhibe en un 50% el crecimiento del microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora (UB). En este contexto, la ausencia de unidades internacionales de actividad para las bacteriocinas, salvo en el caso de NisA, impide no sólo estandarizar los métodos biológicos de análisis de las mismas, sino también la comparación directa de la sensibilidad de diferentes especies y cepas. No obstante, a pesar de su innegable utilidad, sensibilidad y sencillez, ambas pruebas presentan tres inconvenientes que las

convierten en poco reproducibles y fiables: (i) la cuantificación de la actividad antimicrobiana es subjetiva y depende de la sensibilidad de la cepa indicadora, (ii) son pruebas inespecíficas, pues no permiten discriminar otros posibles compuestos o componentes con actividad antimicrobiana y (iii) el crecimiento del microorganismo indicador está influido por diversos factores (por ej.: medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación) (Blom *et al.*, 1997; Martínez, 2000).

II.3.4.9.2. Pruebas genéticas

Las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o de hibridación DNA-DNA, (*Southern-blot*, *dot-blot* e hibridación en colonia) son pruebas genéticas de empleo rutinario que permiten determinar si una bacteria posee el potencial genético de codificar una determinada bacteriocina, mediante la detección específica y rápida de sus genes estructurales y/o secuencias específicas del operón correspondiente (Martínez, 2000). Estas pruebas tienen entre sus ventajas su elevada especificidad y sensibilidad. No obstante, la detección de la presencia del gen estructural de una bacteriocina en un cepa no implica la producción y liberación al medio extracelular de las bacteriocinas correspondientes, ya que en algunos casos pueden constituir genes silentes que no se transcriben o que sólo se expresan bajo determinadas condiciones ambientales (de Vuyst *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b; Citti, 2005). Además, en el caso de la reacción de PCR, no es posible discriminar entre variantes de una misma bacteriocina que difieran en tan sólo unos nucleótidos, por lo que siempre es conveniente confirmar la secuencia nucleotídica de los amplicones obtenidos (Martínez, 2000).

II.3.4.9.3. Pruebas inmunoquímicas

Las pruebas inmunoquímicas constituyen métodos de elección para la detección y cuantificación de bacteriocinas. La mayoría de estas pruebas se basan en la transferencia del antígeno a una superficie inerte, para que, una vez fijado a esa superficie, pueda ser reconocido por un anticuerpo específico, y el complejo antígeno-anticuerpo formado se detectará enzimáticamente. En general, la obtención de anticuerpos específicos frente a bacteriocinas permitiría la detección y cuantificación de bacteriocinas en diferentes sustratos, ya sean los sobrenadantes de los cultivos de los microorganismos productores o los alimentos en los que se encuentran. Además, dichos ensayos pueden servir de referencia para el desarrollo de otras pruebas inmunológicas más complejas, como por ejemplo, las de inmunolocalización e inmunopurificación (Gutiérrez, 2005). No obstante, la utilización de técnicas inmunoquímicas ha tenido un impacto marginal en lo referente a la detección y cuantificación específica de bacteriocinas, comparado con la detección y cuantificación de otros péptidos y proteínas. Esto puede ser debido a la dificultad de generar anticuerpos específicos frente a las bacteriocinas de interés, que se deriva de: (i) el pequeño tamaño de las bacteriocinas, generalmente inferior a 5–10 kDa, lo que las convierte en haptenos, es decir, en sustancias antigénicas reconocidas por anticuerpos específicos pero no inmunógenos o capaces de generar una respuesta inmune; (ii) la ausencia de aminoácidos modificados, excepto en el caso de los lantibióticos, y/o de plegamientos estructurales complejos, lo que también contribuye a su escasa o nula inmunogenicidad (capacidad de generar una respuesta inmune); (iii) la necesidad de bacteriocina purificada en cantidad suficiente para su empleo

durante el proceso de inmunización; (iv) la ausencia de preparados comerciales de bacteriocinas de gran pureza y (v) la escasez de métodos de purificación con rendimientos adecuados (Martínez, 2000).

Por otra parte, en función del tipo de muestra utilizada para la detección de la bacteriocina, las técnicas inmunoenzimáticas se dividen en dos grandes grupos: (i) ensayos basados en la transferencia de células para su posterior reconocimiento immunoquímico (*colony-immunoblot*) y (ii) ensayos basados en la transferencia de sobrenadantes de cepas bacteriocinogénicas o de bacteriocinas (semi-) purificadas para su posterior detección immunoquímica. Dentro del segundo grupo, existen distintos ensayos según la superficie inerte en la que se fijan los antígenos y el tipo de transferencia: (i) *Western-blot*, basado en la transferencia electroforética de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *Polyvinylidene difluoride*); (ii) *spot-immunoblot*, basado en la transferencia directa de las bacteriocinas a una membrana de nitrocelulosa y (iii) ELISA (del inglés *Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay*), basado en la transferencia directa de las bacteriocinas a placas o paletas de poliestireno o polietileno (Gutiérrez, 2005; Criado, 2006).

El empleo de anticuerpos específicos frente a bacteriocinas en pruebas immunoquímicas que permitan su detección y/o cuantificación requiere previamente: (i) la elección del inmunógeno (molécula con capacidad de provocar una respuesta inmune y reaccionar con anticuerpos específicos) que se empleará durante el protocolo de inmunización y frente al que se generarán los anticuerpos; (ii) la obtención de anticuerpos de especificidad predeterminada frente a bacteriocinas en animales de experimentación; (iii) la evaluación de la sensibilidad y especificidad de los inmunoseros obtenidos y (iv) el desarrollo de protocolos eficaces para la detección y cuantificación de las bacteriocinas (Criado, 2006).

II.3.4.9.3.1. Aplicación de anticuerpos frente a bacteriocinas

De forma general, la principal aplicación de los anticuerpos generados frente a bacteriocinas ha sido facilitar su detección y cuantificación en los sobrenadantes de cepas bacteriocinogénicas o en muestras obtenidas durante su purificación a homogeneidad y, sólo en pocas ocasiones, en sustratos alimentarios reales (Falahee *et al.*, 1990; Stringer *et al.*, 1995; Suárez *et al.*, 1996b; Bouksaim *et al.*, 1999, 2000; Daoudi *et al.*, 2001; Leung *et al.*, 2002). No obstante, el potencial de aplicación de estos anticuerpos es muy amplio, incluyendo:

1. Estudios de regulación de la producción de bacteriocinas y estructura-función (Suárez *et al.*, 1996a, b; Horn *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 1998, 1999; Daoudi *et al.*, 2001; Leversee y Glatz, 2001; Kawamoto *et al.*, 2002; Leung *et al.*, 2002; Keren *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b).
2. Estudios de producción de múltiples bacteriocinas por hospedadores heterólogos (Horn *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000b).
3. Evaluación de la especificidad del sistema de transporte de las bacteriocinas, como describieron Kuipers *et al.* (2004) en el caso del sistema de transporte NisT, empleando anticuerpos generados frente al péptido líder de NisA.
4. Inmunolocalización de las bacteriocinas en células productoras, células sensibles y sustratos en los que desarrollan su actividad (Maqueda *et al.*, 1993; Stringer *et al.*, 1995; Bouksaim *et al.*, 1999;

Benech *et al.*, 2002b). Esta técnica requiere la disponibilidad de anticuerpos específicos marcados (por ej.: con partículas de oro) que permitan la visualización mediante microscopía electrónica de los complejos antígeno-anticuerpo y resulta útil no sólo para facilitar el estudio de la biosíntesis de las bacteriocinas y de su mecanismo de acción (Bouksaim *et al.*, 1999, 2000; Benech *et al.*, 2002b), sino también para la determinación *in situ* de la presencia, en forma libre o unida a los constituyentes de los alimentos, de las moléculas de bacteriocinas (Stringer *et al.*, 1995).

5. Inmunopurificación de bacteriocinas (Suárez *et al.*, 1997; Prioult *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 2001; Benech *et al.*, 2002b; Gutiérrez *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2004a). Esta técnica, basada en la inmovilización de los anticuerpos específicos en soportes adecuados (resinas cromatográficas o partículas magnéticas), ha resultado eficaz para la purificación a homogeneidad de bacteriocinas de manera rápida (en una única etapa).

II.3.4.10. APLICACIONES: BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

La mayoría de las técnicas de conservación de los alimentos disponibles actualmente en la industria alimentaria se basan en complejos procesos tecnológicos y en el empleo de aditivos químicos. Sin embargo, cada vez es mayor el número de consumidores que demandan productos “más naturales”, menos procesados e, incluso, libres de aditivos químicos. En este contexto, la bioconservación es una alternativa que permite asegurar la seguridad de estos alimentos y, por lo tanto, satisfacer la demanda de los consumidores actuales. En este sentido, la bioconservación se define como “la prolongación de la vida útil y el incremento de la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de compuestos naturales de origen animal, vegetal o microbiano que no ejercen efectos perjudiciales sobre la salud de los consumidores” (Stiles, 1996; Cintas y Casaús, 1998) o incluso como “la prolongación de la vida útil y el incremento de la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de la microflora natural o sus metabolitos” (Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998). Hasta la fecha, se han realizado numerosos estudios que demuestran la eficacia de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus metabolitos como bioconservantes para inhibir el desarrollo y/o eliminar la presencia de un gran número de microorganismos patógenos y alterantes presentes en diversos alimentos (por ej.: leche, quesos, productos lácteos, productos cárnicos, vegetales, pescados, mariscos, ensaladas, alimentos enlatados, ovoproductos, vino, cerveza, bebidas analcohólicas y productos de panadería) (Daeschel, 1993; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cintas y Casaús, 1998; O’Sullivan *et al.*, 2002a; Työppönen *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2004, 2005; Cotter *et al.*, 2005b; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Por consiguiente, el empleo de bacterias lácticas y/o sus metabolitos como bioconservantes alimentarios, formando parte de un sistema de barreras múltiples, constituye una alternativa, fácilmente aceptable por los consumidores, las agencias sanitarias y empresas alimentarias, que permitiría obtener productos más naturales, más saludables y con menos aditivos químicos (Stiles, 1996; Cintas y Casaús, 1998; O’Sullivan *et al.*, 2002a; Ross *et al.*, 2002; Devlieghere *et al.*, 2004; Deegan *et al.*, 2006).

Conviene destacar que de los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas (sección II.3.2), las bacteriocinas producidas por microorganismos de los géneros *Carnobacterium*,

Lactobacillus, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* poseen un gran potencial como bioconservantes en la industria alimentaria (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Schillinger *et al.*, 1996; Cintas y Casaús, 1998; Cotter *et al.*, 2005b; Gálvez *et al.*, 2007), lo que es debido a algunas de sus características, entre las que se incluyen:

1. Su producción por bacterias que, debido a la larga tradición de su empleo en alimentos fermentados sin problemas higiénico-sanitarios asociados, son consideradas microorganismos GRAS y/o QPS (Schillinger *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2000d) (sección II.3.3).
2. Naturaleza proteica (sección II.3.4.2), por lo que las bacteriocinas se inactivarían presumiblemente por las enzimas proteolíticas del tracto digestivo (principalmente gástricas) (Piard y Desmazeaud, 1991; Cintas *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b; Bernbom *et al.*, 2006) y, por lo tanto, no originarían disbiosis intestinales.
3. Ausencia de capacidad inmunógena (sección II.3.4.9.3), por lo que no ocasionarían fenómenos alérgicos.
4. Amplio espectro de acción antimicrobiana y potente actividad frente a microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en diversos alimentos, como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Cl. botulinum* (sección II.3.4.3). Además, pueden actuar sinérgicamente con otros sistemas de conservación de los alimentos (Gould, 1996).
5. Resistencia a diversos tratamientos tecnológicos de conservación aplicados a los alimentos (por ej.: pasteurización, liofilización y acidificación).
6. Ausencia de actividad biológica frente a células eucariotas.

Como se mencionó anteriormente (sección II.2.2.4.1), entre las aplicaciones de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas y/o sus bacteriocinas como bioconservantes de los alimentos se incluye su empleo para: (i) la mejora de su calidad higiénico-sanitaria y seguridad y la extensión de su vida útil, por su actividad inhibidora del desarrollo de microorganismos patógenos y/o alterantes potencialmente presentes en los alimentos y (ii) la mejora de la calidad y características organolépticas de los alimentos, por su actividad inhibidora del desarrollo de la flora NSLAB (Hugas, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Ryan *et al.*, 2002; Chen y Hoover, 2003; Cotter *et al.*, 2005b; Guinane *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006; Drider *et al.*, 2006).

De forma general, existen tres estrategias para la aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios: (i) inoculación del alimento con la bacteria láctica bacteriocinogénica, para que ésta produzca la bacteriocina *in situ* (cultivo protector y/o cultivo iniciador); (ii) adición como ingrediente alimentario de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica y (iii) adición como aditivo alimentario de la bacteriocina purificada o parcialmente purificada (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Ross *et al.*, 1999; Chikindas y Montville, 2002; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007; Gálvez *et al.*, 2007). Prácticamente cualquier bacteria láctica bacteriocinogénica y/o bacteriocina puede emplearse en la industria alimentaria bajo las dos primeras formas de aplicación. De hecho, las bacterias lácticas bacteriocinogénicas se han utilizado de forma empírica o inadvertidamente durante siglos en las

fermentaciones alimentarias (Stiles, 1996). En lo que se refiere a la tercera estrategia, el empleo de bacteriocinas como aditivos alimentarios está sujeto a la regulación de la lista positiva de estas sustancias y, en la actualidad, la única bacteriocina autorizada para tal fin es NisA (conservante alimentario E-234), en determinados tipos de productos. A este respecto, en la U.E. está permitida la utilización de NisA como conservante (E-234) en determinados tipos de quesos, productos lácteos y postres. Asimismo, en Australia y Nueva Zelanda también está permitida su adición como conservante de la cerveza (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Riley y Wertz, 2002; Twomey *et al.*, 2002; Delves-Broughton, 2005). En este contexto, para que se acepte legalmente el empleo de una bacteriocina como aditivo alimentario se requieren numerosos estudios bioquímicos, genéticos y toxicológicos, que suponen un coste económico muy importante (Schoeman *et al.*, 1999; Deegan *et al.*, 2006), lo que provoca que su empleo como bioconservante se realice mediante cualquiera de las otras dos estrategias. Así pues, actualmente, se comercializan diversos medios fermentados por cepas bacteriocinogénicas como ingredientes alimentarios, tal es el caso del medio *ALTA 2341TM* (fermentado por *P. acidilactici*) (Daeschel, 1989; Cotter *et al.*, 2005b). Asimismo, la producción *in situ* de bacteriocinas representa una alternativa muy interesante desde el punto de vista económico, ya que no lleva asociado el coste adicional necesario para su empleo como aditivo alimentario y, además, proporciona una fuente de bacteriocina más duradera (McMullen y Stiles, 1996; Benkerroum *et al.*, 2002).

Hasta la fecha, NisA y PedPA-1 son las bacteriocinas de las bacterias lácticas que han tenido mayor aceptación comercial para utilizarse como bioconservantes alimentarios, no obstante, otras bacteriocinas han mostrado resultados prometedores tanto a nivel industrial como en ensayos de laboratorio (Diep y Nes, 2002). En este sentido, el empleo de las bacterias lácticas en los productos lácteos ha tenido una larga y segura trayectoria, principalmente como cultivos iniciadores para la elaboración del queso (O'Sullivan *et al.*, 2002a). En la industria láctea se utilizan frecuentemente los nitratos para prevenir la germinación de los esporos de microorganismos del género *Clostridium*, lo que constituye un problema frecuente durante la producción de quesos debido a la producción de toxina botulínica por *Cl. botulinum* o a la sobreproducción de ácido butírico por *Clostridium tyrobutyricum* (Schillinger *et al.*, 1996; Cleveland *et al.*, 2001). No obstante, la problemática higiénico-sanitaria de la utilización de estos conservantes químicos puede evitarse mediante el empleo de NisA como se ha descrito para la elaboración de queso “Gouda”, “Camembert”, “Cheddar” y “Cottage” (Benkerroum y Sandine, 1988; Hugenholtz y de Veer, 1991; Maisnier-Patin *et al.*, 1992; Zottola *et al.*, 1994; Delves-Broughton *et al.*, 1996). Además, NisA posee un amplio y potente espectro antimicrobiano, en el que se incluyen microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos como *L. monocytogenes* y bacterias Gram-positivas formadoras de esporos como *Cl. botulinum* (Schillinger *et al.*, 1996; Cleveland *et al.*, 2001). Por ello, en la actualidad se utiliza como bioconservante de una gran variedad de productos lácteos (por ej.: quesos procesados y para untar, quesos acidificados, postres lácteos pasteurizados, leche fresca pasteurizada y sus mezclas), así como de huevo líquido (Maisnier-Patin *et al.*, 1992; Benech *et al.*, 2002a, b; Twomey *et al.*, 2002; Garneau *et al.*, 2003). Por otra parte, un gran número de bacteriocinas distintas de NisA podrían emplearse como bioconservantes de los productos lácteos, entre las que destacan las siguientes: (i) Ltn3147 inhibe el desarrollo de *L.*

monocytogenes Scott A y *B. cereus* en quesos “Cottage”, quesos madurados con mohos, yogurt natural y leche de bebés (McAuliffe *et al.*, 1999; Papagianni, 2003; Deegan *et al.*, 2006). Asimismo, Ltn3147 y lacticina 99 permiten mejorar la calidad y características organolépticas de los quesos mediante el control de la flora láctica que no forma parte del cultivo iniciador (flora NSLAB) (Uljas y Luchansky, 1995; Ryan *et al.*, 1996; Fenelon *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2001; Deegan *et al.*, 2006); (ii) PedPA-1, producida heterológamente por cepas de *Lc. lactis* y *Lb. plantarum*, se emplea como cultivo iniciador para la elaboración de queso “Cheddar” y como espray sobre la superficie de queso “Munster” debido a que inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* (Buyong *et al.*, 1998; Ennahar *et al.*, 1998); (iii) la pediocina 5 inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en leche (Huang *et al.*, 1994); (iv) la cepa *E. faecium* F58, productora de la enterocina F58, reduce el crecimiento de *L. monocytogenes* CECT 4032 serovar 4b en 1–4 unidades logarítmicas cuando son cocultivadas en leche de cabra y, además, inhibe el desarrollo de esta cepa en los quesos “Jben” (Achemchem *et al.*, 2006); (v) Psc126, producida por *Carnobacterium maltaromaticum* JG126, inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en quesos “Camembert” (Wan *et al.*, 1997); (vi) la linocina M-18, producida por *Brevibacterium lines*, inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en quesos rojos (Eppert *et al.*, 1997); (vii) la variacina, producida por *Kocuria varians*, se ha empleado para producir un producto lácteo que inhibe a *B. cereus* en productos lácteos refrigerados y postres de vainilla y chocolate (O’Mahony *et al.*, 2001) y (viii) EntA, EntP y EntAS-48, producidas por cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*, inhiben el desarrollo de *L. monocytogenes* durante la elaboración de los quesos “Cottage”, “Feta”, “Manchego”, “Taleggio” y “Cheddar” (Giraffa *et al.*, 1995; Núñez *et al.*, 1997; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2008). Asimismo, EntA, producida por *E. faecium* CCM 4231, inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* y *S. aureus* en leche de soja (Lauková y Czikková, 1999). Por otra parte, LciA, LciB, LciM, Ltn 3147, Ltn481 y EntAS-48 presentan un efecto lítico sobre las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores del queso “Cheddar”, produciéndose una disminución del tiempo de maduración y afectando positivamente a su calidad y a sus características organolépticas (Chapot-Chartier *et al.*, 1994; Crow *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1999; Martínez-Cuesta *et al.*, 2001; Oumer *et al.*, 2001; O’Sullivan *et al.*, 2002b; Peláez y Requena, 2005).

En lo que respecta a la bioconservación de la carne fresca y los productos cárnicos fermentados, la utilización de NisA ha sido ampliamente estudiada, si bien se ha observado su ineficacia debido a su unión a grupos sulfhidrilos de las proteínas o a partículas de carne (Chung *et al.*, 1989; Deegan *et al.*, 2006) y a su fuerte interacción con los fosfolípidos, lo que principalmente limita su actividad en carnes con un alto contenido de grasas (Henning *et al.*, 1986). No obstante, el empleo de NisA ha resultado ser efectiva en: (i) salchichas del tipo “Bolonia” que contenían una menor cantidad de grasa (Davies *et al.*, 1999), (ii) en carne de ternera para inhibir el desarrollo de *Brochothrix thermosphacta* (Cutter y Siragusa, 1998) y (iii) jamón para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* (Jofré *et al.*, 2007). Además, en la industria cárnica se utilizan frecuentemente los nitritos para estabilizar el color rojo de las carnes y para prevenir la germinación de los esporos de microorganismos del género *Clostridium*. Sin embargo, estos nitritos pueden reaccionar con aminas secundarias en las carnes formándose nitrosaminas carcinogénicas (Chen y Hoover, 2003). Esta problemática higiénico-sanitaria de la

utilización de estos conservantes químicos puede evitarse mediante el empleo combinado de NisA y nitritos ya que inhiben la formación de esporas de *Clostridium sporogenes* y retrasan la producción de toxina botulínica por *Cl. botulinum* (Rayman *et al.*, 1981; Taylor *et al.*, 1985). Por otra parte, diversos estudios han puesto de manifiesto que las bacteriocinas producidas por microorganismos de los géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* y *Lactobacillus*, entre otros, poseen un mayor potencial como bioconservantes de los productos cárnicos que NisA (Stiles y Hastings, 1991; O'Sullivan *et al.*, 2002a). A este respecto, la incorporación de cepas de *P. acidilactici* productoras de PedPA-1 en salchichas tipo “Frankfurter”, de pavo, pollo y en embutidos fermentados permite inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* (Berry *et al.*, 1991; Foegeding *et al.*, 1992; Luchansky *et al.*, 1992; Baccus-Taylor *et al.*, 1993). Asimismo, el empleo combinado de PedPA-1 junto con el envasado de carnes en atmósferas modificadas permite reducir la incidencia de alteraciones producidas por bacterias Gram-negativas (Stiles y Hastings, 1991). Por otra parte, la incorporación de LeuA, producida por *Leuconostoc gelidum* UAL 187, en carne de ternera picada y envasada al vacío permite retrasar la alteración producida por *Lb. sakei* durante 6–8 semanas (Leisner *et al.*, 1996). Asimismo, se ha demostrado la eficacia de la utilización de EntA, EntB, EntAS-48, EntCRL35 y enterocina 416K1 (Ent416K1), SakA, SakK, SakP y SakX, la lactocina 705, leucocina A-4010, Psc126 y plantaricina 423 (Plt423), entre otras bacteriocinas, para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en pechugas de pollo, jamón, cerdo, pato, carne de ternera, avestruz, salchichas y embutidos fermentados (Schillinger, *et al.*, 1991; Holck, *et al.*, 1994a, b; Tichaczek *et al.*, 1994; Jack *et al.*, 1996; Vignolo *et al.*, 1996; Hugas *et al.*, 1998; Lauková *et al.*, 1999b; Aymerich *et al.*, 2000a, c; Callewaert *et al.*, 2000; Vignolo *et al.*, 2000; Budde *et al.*, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Sabia *et al.*, 2003; Dicks *et al.*, 2004; Ananou *et al.*, 2005; Benkerroum *et al.*, 2005; Héquet *et al.*, 2007; Jofré *et al.*, 2007). Finalmente, el empleo de cepas productoras de bacteriocinas (por ej.: Ltn3147 y curvacina A [CurA]) como adjuntos del cultivo iniciador han permitido mejorar las características organolépticas de productos cárnicos como el salami y embutidos fermentados (Vogel *et al.*, 1993; Coffey *et al.*, 1998).

Por otra parte, el deterioro del pescado fresco es causado generalmente por microorganismos Gram-negativos que, de forma general, no son sensibles a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas de las bacterias lácticas, por lo que muy pocos investigadores han evaluado su eficacia como bioconservantes de estos productos (O'Sullivan *et al.*, 2002a). Sin embargo, en el pescado envasado al vacío, microorganismos Gram-positivos como, entre otros, *Cl. botulinum* y *L. monocytogenes* pueden causar graves problemas sanitarios, habiéndose descrito su inhibición por diversas bacteriocinas (Degnan *et al.*, 1994; Einarsson y Lauzon, 1995; Nilsson *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2004b, 2006). A este respecto, algunos investigadores han evaluado la eficacia de la adición de cultivos bacteriocinogénicos en estos productos. Así pues, se ha descrito el crecimiento y la producción de bacteriocinas por *Carnobacterium divergens* V41, *C. piscicola* VI, *C. piscicola* SF668, *C. piscicola* A9b y *C. piscicola* CS256 en pescado ahumado conservado a 4 y 5°C, lo que permitió inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* en este producto (Duffes *et al.*, 1999a, b; Nilsson *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 2003; Brillet *et al.*, 2004; Nilsson *et al.*, 2004). Más recientemente, Connil *et al.* (2002) demostraron el potencial de *C. divergens* V41, microorganismo productor de divercina V41,

como bioconservante del salmón ahumado refrigerado bajo diferentes condiciones de temperatura y diferentes concentraciones de glucosa y sal. Asimismo, Katla *et al.* (2001) y Aasen *et al.* (2003) han demostrado la eficacia de SakP para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* en salmón ahumado conservado. Por otra parte, se ha comprobado la eficacia de NisA para la conservación de filetes de pescado ahumado y de NisZ y BavA, producida por *Lactobacillus bavaricus* MI 401, para la conservación de camarones (Einarsson y Lauzon, 1995).

En lo que respecta a la bioconservación de productos vegetales y fruta, Plinio “El Viejo” describía en el siglo I d.C. la conservación de la col blanca en vasijas de barro especiales, empleadas sucesiva y únicamente para este fin; no existe duda de que bajo las condiciones descritas por Plinio, la col se fermentaba a “*Sauerkraut*” por la acción de los microorganismos que quedaban retenidos en los poros de las vasijas y que procedían de una fermentación anterior (Cintas y Casaus, 1998). Durante esta fermentación, producida por *Leuconostoc mesenteroides*, se produce dióxido de carbono y ácidos orgánicos que inhiben el desarrollo de la mayoría de los microorganismos indeseables debido a las condiciones anaeróbicas y el descenso de pH creados. A pesar de ello, se puede producir el desarrollo de cepas de *Lb. plantarum* que alteran este producto, no obstante, se ha demostrado que el empleo de NisA y cepas de *Le. mesenteroides* resistentes a ésta, permiten que se desarrolle esta fermentación y que se produzca la inhibición de estas cepas de *Lb. plantarum* (Steinkraus, 1982; Harris *et al.*, 1992a, b; Settanni y Corsetti, 2008). En la actualidad, la manipulación y el sistema de envasado, que requieren los productos de origen vegetal, dificultan a veces el mantenimiento de temperaturas de refrigeración adecuadas, lo que proporciona un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos patógenos. Por ello, se ha evaluado el empleo de cultivos de cepas productoras de bacteriocinas como una barrera antimicrobiana adicional en este tipo de alimentos (O’Sullivan *et al.*, 2002a). A este respecto, Cai *et al.* (1997) demostraron que el cocultivo de *Lc. lactis* HPB1688, productor de NisZ, con *L. monocytogenes* en los envases de ensalada fresca cortada y lista para su consumo permitía reducir aproximadamente 10 veces la población de este patógeno después del almacenamiento del producto entre 7–10°C durante 10 días. Este mismo grupo demostró que una enterocina producida por una cepa de *E. faecium* era capaz de reducir la población de *L. monocytogenes* en ensalada “*Caesar*”. En otro estudio, Allende *et al.* (2007) demostraron que la aplicación de NisZ y coagulina, independiente y conjuntamente en una solución de lavado, permite inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en ensalada fresca y cortada. Por otra parte, la munditicina AT06, producida por *E. mundtii* AT06, inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* en habichuelas (Bennik *et al.*, 1998; Settanni y Corsetti, 2008). Otro problema asociado a los vegetales frescos es la posibilidad de que vehiculen una contaminación bacteriana con coliformes o enterococos como resultado de unas inadecuadas condiciones higiénicas durante su manipulación. A este respecto, Vescovo *et al.* (1995) demostraron que al tercer día de la inoculación de cepas de *Lb. casei* en vegetales refrigerados envasados y listos para su consumo se observó un marcado efecto inhibitorio, lo que permitió reducir drásticamente o eliminar la presencia de coliformes o enterococos, respectivamente, en el producto. Por otra parte, Ruiz-Barba *et al.* (1994) y de Castro *et al.* (2002) demostraron que la utilización de *Lb. plantarum* LPCO10 (productor de PltS y PltT) y de *Enterococcus casseliflavus* cc45 (en combinación con *Lactobacillus pentosus* CECT 5138)

como cultivos iniciadores, permite controlar la fermentación de aceitunas verdes de estilo español. Asimismo, Komitopoulou *et al.* (1999) y Grande *et al.* (2005) demostraron que NisA y EntAS-48, respectivamente, son efectivas para controlar las alteraciones organolépticas producidas por *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas. Además, EntAS-48 inhibe el crecimiento de: (i) *Bacillus licheniformis* en zumo de manzana y sidra (Grande *et al.*, 2006b); (ii) *B. cereus* en alimentos a base de arroz y puré de verduras (Grande *et al.*, 2006a, 2007b); (iii) *Bacillus coagulans* en frutas y productos vegetales enlatados (Lucas *et al.*, 2006) y (iv) *S. aureus* en salsas vegetales (Grande *et al.*, 2007a; Settanni y Corsetti, 2008). Finalmente, EntEJ97 producida por *E. faecalis* EJ97 inhibe el crecimiento de *Bacillus macroides* y *Bacillus maroccanus* en purés de verduras (Settanni y Corsetti, 2008).

Los estudios realizados sobre la posible utilidad de las bacteriocinas de las bacterias lácticas como bioconservantes de la cerveza son muy escasos y se han basado principalmente en el empleo de NisA. A este respecto, estudios recientes han demostrado la eficacia de NisA para inhibir las alteraciones microbianas producidas por las bacterias lácticas en la cerveza (sección II.1.7.1) (Ogden y Tubb, 1985; Ogden, 1986; Ogden y Waites, 1986; Delves-Broughton *et al.*, 1996) y en el vino (Radler, 1990a, b; Daeschel *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 2000; Rojo-Bezares *et al.*, 2007a). Estos estudios demuestran que mientras las bacterias lácticas alterantes de estas bebidas alcohólicas son sensibles a NisA, la actividad biológica de la levadura *Sc. cerevisiae* y las características organolépticas de los productos finales no se ven afectadas. De este modo, NisA podría emplearse en la industria cervecera para: (i) prevenir y/o controlar posibles contaminaciones durante el proceso de fermentación, (ii) eliminar posibles contaminaciones bacterianas durante los lavados de la levadura, (iii) reducir los tiempos de pasteurización y/o (iv) aumentar la vida media de cervezas no pasteurizadas (Delves-Broughton *et al.*, 1996). En este sentido, como se mencionó anteriormente, el empleo de NisA como aditivo antimicrobiano en cerveza está autorizado en Australia y Nueva Zelanda (Delves-Broughton *et al.*, 1996). Por otra parte, las aplicaciones de NisA en la industria del vino son similares, no obstante, no podría utilizarse en los vinos en los que la fermentación maloláctica determina sus características organolépticas (Delves-Broughton *et al.*, 1996), o se requerirían cepas de bacterias lácticas resistentes a NisA y capaces de desarrollar esta fermentación (Daeschel *et al.*, 1991). Además, Chihib *et al.* (1999) demostraron que NisA, en combinación con otros factores de estrés microbiano (por ej.: temperatura y pH), inhibe el desarrollo de *P. frisingensis*, una bacteria Gram-negativa anaerobia alterante de la cerveza (sección II.1.7.2.1). Asimismo, se ha descrito el aislamiento de malta y sorgo de cepas bacteriocinogénicas de los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* que poseen la capacidad de inhibir el desarrollo de las principales bacterias lácticas alterantes de la cerveza (O'Mahony *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2001; Hartnett *et al.*, 2002). Además, se han purificado a homogeneidad 11 de estas bacteriocinas lo que ha resultado en el reconocimiento de que todas ellas pertenecen a la clase II, siendo algunas bacteriocinas nuevas (por ej.: SakX y SakT) y, la mayoría, idénticas a otras ya descritas aisladas de sustratos diferentes como SakP, LeuA y MesY105. Por otra parte, se ha descrito el aislamiento de cerveza alterada de la cepa bacteriocinogénica *Lb. plantarum* 423, así como la purificación y caracterización de la bacteriocina responsable de su actividad

antimicrobiana (Plt423) (van Reenen *et al.*, 1998). En un estudio reciente, Vaughan *et al.* (2004) demostraron que la cepa *Lc. lactis* M30, aislada de cebada, produce y secreta su bacteriocina, idéntica a Ltn3147 (Settanni *et al.*, 2005), en mosto cervecero. Asimismo, esta bacteriocina, inoculada en cerveza, inhibe el desarrollo de la cepa alterante de cerveza *Lb. brevis* BSH9 y, además, permanece biológicamente activa tras someterse a los tratamientos térmicos de pasteurización de la cerveza y almacenamiento a 30°C y refrigeración, no obstante, pierde su actividad antimicrobiana después de 12 h de fermentación y cuando se adiciona y somete a ebullición en mosto con lúpulo. Por otra parte, Navarro *et al.* (2000) aislaron, de productos vinícolas y vino, nueve cepas de *Lb. plantarum* con actividad bacteriocinogénica frente a otras bacterias lácticas, entre las que *Lb. plantarum* J23 y J51 fueron las cepas con mayor actividad antimicrobiana. Además, *Lb. plantarum* J23 sólo mostró actividad antimicrobiana frente a cepas de *Oenococcus oeni* y cepas de los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus*, cuando se cocultiva con otras bacterias lácticas (Rojo-Bezares *et al.*, 2007b). Por otra parte, Schoeman *et al.* (1999) propusieron la construcción de cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* con la capacidad de producir bacteriocinas de interés para la bioconservación de la cerveza, el vino y los productos de panadería durante el proceso de fermentación. En este sentido, PedPA-1 y Plt423 se han expresado heterológicamente en cepas de *Sc. cerevisiae* (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003) (sección II.6.1).

A pesar del potencial práctico de las bacteriocinas de las bacterias lácticas descrito anteriormente, la eficacia de estas sustancias y/o de las cepas bacteriocinogénicas en aplicaciones industriales puede resultar alterada por diversos factores que afectan a la capacidad bacteriocinogénica de las cepas empleadas y/o a la actividad antimicrobiana de sus bacteriocinas (Nettles y Barefoot, 1993; Daeschel, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Stiles, 1996; Callewaert *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2000d; Aasen *et al.*, 2003; Bhatti *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2007). Entre los factores que afectan desfavorablemente a la capacidad bacteriocinogénica destacan: (i) la existencia de un ambiente inadecuado (por ej.: pH, temperatura y nutrientes) para la síntesis de bacteriocinas en cantidad suficiente; (ii) la presencia de fagos que destruyan o retrasen el crecimiento de las cepas bacteriocinogénicas; (iii) la pérdida espontánea de tal capacidad (sólo cuando sus determinantes genéticos se localizan en plásmidos u otros elementos genéticos transmisibles) y (iv) la incapacidad de la cepa bacteriocinogénica de desarrollarse debido a fenómenos de antagonismo ejercidos por otros microorganismos presentes en el alimento. Por otra parte, entre los factores que influyen negativamente en la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas destacan: (i) la aparición de microorganismos resistentes; (ii) la existencia en el alimento de condiciones (por ej.: pH, proteasas, procesos oxidativos y aditivos alimentarios) que alteren su estructura y/o función; (iii) su unión a ciertos componentes de los alimentos (por ej.: proteínas y partículas de grasa) y (iv) la dificultad para lograr su solubilización y/o distribución uniforme en la matriz alimentaria, especialmente en los alimentos elaborados con materias primas sólidas o semisólidas. No obstante, las bacteriocinas pueden actuar sinérgicamente con otros métodos de conservación y/o compuestos antimicrobianos utilizados en la industria alimentaria, entre los que se incluyen: (i) el acetato y lactato de sodio y el sorbato de potasio, que aumentan la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas (por ej.: NisA, PedPA-1 y Ltn3147) frente a *L.*

monocytogenes, *Cl. perfringens* y *Sa. enterica* en diversos productos cárnicos (Scannell *et al.*, 2000a; Uhart *et al.*, 2004; Bari *et al.*, 2005); (ii) el ácido cítrico, fítico y láctico, que incrementan la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas (por ej.: NisA y PedPA-1) frente a *L. monocytogenes* en carne fresca (Cleveland *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2005); (iii) el ácido acético, cítrico y láctico, los benzoatos y sorbatos, que aumentan la actividad antimicrobiana de EntAS-48 a pH ácido (4,5) frente a *S. aureus* CECT 976 (Ananou *et al.*, 2007); (iv) los agentes químicos de grado alimentario (por ej.: EDTA), que alteran la permeabilidad de las membranas externas de los microorganismos Gram-negativos, lo que les sensibiliza a diversas bacteriocinas (por ej.: NisA) (Stevens *et al.*, 1991; Siragusa *et al.*, 1999) y (v) los tratamientos térmicos, de altas presiones y campos eléctricos, que potencian la actividad antimicrobiana de diversas bacteriocinas (por ej.: NisA, PedPA-1, EntA, EntB, EntAS-48, EntL50, SakP y Ltn3147) frente a *L. monocytogenes*, *Listeria innocua*, *S. aureus* y *E. coli* 0157:H7 en diversos productos cárnicos y quesos (Morgan *et al.*, 2001; Garriga *et al.*, 2002; Arques *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007). Por todo lo anterior, y de acuerdo con el concepto actual de la “tecnología de los obstáculos” (Leistner y Gorris, 1995; Leistner, 2000), desarrollado inicialmente por Leistner (1992), las bacteriocinas deberían emplearse como un factor antimicrobiano adicional en un sistema de barreras constituido por múltiples y diversos factores (barreras o métodos) de conservación (físicos, químicos o biológicos) (Cleveland *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2005; Mahapatra *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). De esta manera, gracias al efecto sinérgico antimicrobiano derivado de la presencia simultánea de diferentes factores de conservación, podría reducirse la intensidad de los tratamientos aplicados y/o la concentración de sustancias potencialmente peligrosas en los alimentos y, así, aprovechar el potencial de las bacteriocinas como bioconservantes para la obtención de alimentos seguros, con un menor contenido de aditivos químicos y sometidos a tratamientos tecnológicos menos intensos (Leistner y Gorris, 1995; Leistner, 2000).

En la actualidad, gran parte de las investigaciones sobre las bacteriocinas de las bacterias lácticas se dirigen a eliminar o reducir al máximo los problemas que plantean algunos de los factores expuestos anteriormente y que suponen una importante limitación para la generalización del empleo de estos péptidos antimicrobianos como bioconservantes alimentarios, y el desarrollo de diversas estrategias con la finalidad de aumentar la eficacia de las bacteriocinas en los alimentos (Nettles y Barefoot, 1993; Abee *et al.*, 1995; McMullen y Stiles, 1996; Martínez *et al.*, 2000d), tales como: (i) empleo combinado de varias bacteriocinas, con el objeto de aumentar su eficacia y espectro de acción antimicrobiana y reducir la tasa de poblaciones bacterianas resistentes (Hanlin *et al.*, 1993; Schillinger *et al.*, 1996; Mulet-Powel *et al.*, 1998); (ii) expresión heteróloga de genes que codifican bacteriocinas en cultivos iniciadores y/o adjuntos (Fernández *et al.*, 2005a, b); (iii) diseño de agrupaciones génicas que permitan la producción de múltiples bacteriocinas (Fernández *et al.*, 2005a, b); (iv) diseño, mediante ingeniería genética y proteica, de moléculas con mayor estabilidad y/o solubilidad y con un espectro de actividad antimicrobiana más amplio (Fimland *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1997a; Fimland *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998; Pag y Sahl, 2002a, b; Cotter *et al.*, 2005a; Gillor *et al.*, 2005) e (v) incorporación de bacteriocinas en los envases (Siragusa *et al.*, 1999; Scannell *et al.*, 2000b; Quintavalla y Vicini, 2002; Cha *et al.*, 2003; Neetoo *et al.*, 2007; Iseppi *et al.*, 2008).

II.4. GÉNERO *Enterococcus*

II.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS

Filogenéticamente, los géneros *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* constituyen un supergrupo dentro del grupo de las bacterias lácticas (sección II.3) (Stiles y Holzapfel, 1997; Franz *et al.*, 1999a). El género *Enterococcus* fue propuesto inicialmente por Schleifer y Kilpper-Bälz (1984) para incluir taxonómicamente a las especies clasificadas previamente como *Streptococcus faecalis* (actualmente *E. faecalis*) y *Streptococcus faecium* (actualmente *E. faecium*). Posteriormente, se transfirieron a este género otras especies de estreptococos del grupo D de Lancefield (poseedoras del antígeno D). Actualmente, este género agrupa microorganismos Gram-positivos, no esporulados, anaerobios facultativos, catalasa-negativos, de morfología cocoide, capaces de resistir tratamientos térmicos de 60°C durante 30 min y, en general, capaces de desarrollarse: (i) en el rango de temperaturas entre 10 y 45°C; (ii) en presencia de cloruro de sodio al 6,5% (m/vol); (iii) en el rango de pH entre 4,6 y 9,6–10 y (iv) en presencia de azida de sodio al 0,04% (m/vol) (Mundt, 1986; Devriese y Pot, 1995; Hardie y Whiley, 1997; Stiles y Holzapfel, 1997; Casaus, 1998; Franz *et al.*, 1999a; Cintas *et al.*, 2000c; Flint, 2000; Giraffa, 2000; Domig *et al.*, 2003a, b; Franz *et al.*, 2003; Klein, 2003; Martínez *et al.*, 2003; Ogier y Serror, 2008). Por otra parte, los enterococos producen L(+)-ácido láctico, a través del metabolismo homofermentativo de la glucosa, y también pueden obtener energía a partir de la degradación de ciertos aminoácidos (Stiles y Holzapfel, 1997). En lo que respecta a su contenido de G+C, todas las especies del género presentan 38–41 mol% (Mundt, 1986; Devriese y Pot, 1995). Además, la mayoría de los enterococos pueden hidrolizar la esculina en presencia de un 40% de sales biliares (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

En la actualidad, con base en los estudios comparativos de la secuencia de ADN que codifica la fracción 16S del ARNr, las 37 especies que actualmente constituyen el género *Enterococcus* se clasifican en siete grupos (Tabla II.8): (i) *Enterococcus avium*, (ii) *E. casseliflavus*, (iii) *Enterococcus cecorum*, (iv) *Enterococcus dispar*, (v) *E. faecalis*, (vi) *E. faecium* y (vii) *Enterococcus saccharolyticus* (Devriese y Pot, 1995; Franz *et al.*, 2003; Klein, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Entre las 37 especies de este género no se encuentran: (i) *Enterococcus solitarius*, se ha reclasificado como *Tetragenococcus* spp. y (ii) *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus porcinus*, *Enterococcus sacharominimus* y *Enterococcus seriolicida*, que están a la espera de reclasificarse como *E. casseliflavus*, *Enterococcus villorum*, *Enterococcus italicus* y *Lactococcus garvieae*, respectivamente, (Klein, 2003; Devriese *et al.*, 2005; DSMZ, 2005; Facklam, 2005).

Los microorganismos del género *Enterococcus* se caracterizan por su gran adaptabilidad a condiciones ambientales adversas (por ej.: pH, temperatura y salinidad), como queda de manifiesto por su amplia distribución en la naturaleza. Así pues, los enterococos se han aislado de una gran variedad de alimentos (sección II.4.3.1), plantas, suelo, aguas superficiales e insectos (Facklam y Sahn, 1995; Casaus, 1998; Franz *et al.*, 1999a; Giraffa, 2002, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Kühn *et al.*, 2003; Devriese *et al.*, 2005; Ogier y Serror, 2008), y forman parte de la flora habitual del tracto gastrointestinal del

hombre y de la mayoría de animales, pudiendo encontrarse también en las mucosas de la cavidad oral y del tracto superior de la vagina humana, en la leche materna, así como del tracto gastrointestinal de rumiantes, cerdos, aves, perros, gatos y algunos mamíferos salvajes (Franz *et al.*, 1999a; Witte *et al.*, 1999; Klare *et al.*, 2001; Tannock y Cook, 2002; Kayser, 2003; Klein, 2003; Devriese *et al.* 2005; Martín, 2005).

Tabla II.8. Especies incluidas en el género *Enterococcus*

Grupo	Especie
<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. pseudoavium</i> <i>E. raffinosus</i>
<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> <i>E. columbae</i>
<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i> <i>E. asini</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. haemoperoxidus</i> <i>E. moraviensis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. villorum</i>
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. saccharolyticus</i> <i>E. sulfureus</i>
Otras especies (aún no clasificadas)	<i>E. aquimarinus</i> , <i>E. azikeevi</i> , <i>E. caccae</i> , <i>E. canis</i> , <i>E. canintestini</i> , <i>E. devriesei</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. hermanniensis</i> , <i>E. inusitatus</i> , <i>E. italicus</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. pallens</i> , <i>E. phoeniculicola</i> , <i>E. rattus</i> , <i>E. rottiae</i> , <i>E. silesiacus</i> , <i>E. termitis</i>

Adaptado de Klein (2003) y Criado (2006).

Por otra parte, las especies que se aíslan del hombre con mayor frecuencia son *E. faecalis* y *E. faecium*, si bien la incidencia de estas dos especies parece estar influida por diversos factores tales como la edad del hospedador y la dieta. A este respecto, en países como Reino Unido y EE.UU., se aíslan mayoritariamente cepas de *E. faecalis*, mientras que, por ejemplo, en India, Japón y Uganda la incidencia de *E. faecium* es igual o superior a la de *E. faecalis* (Gelsomino *et al.*, 2003). Por otra parte, las aves de corral portan y excretan un alto contenido de *E. faecalis* durante las primeras semanas de vida, si bien durante su desarrollo posterior descende su presencia; sin embargo, la población de *E. faecium* se mantiene constante durante su crecimiento y aumenta la presencia de *E. cecorum* (Devriese *et al.*, 1991). Asimismo, se ha observado que en determinados hospedadores los enterococos constituyen la flora intestinal predominante durante los primeros 2–3 días de vida y que, tras aproximadamente dos semanas, su presencia se reduce considerablemente (Devriese *et al.*, 1992).

II.4.2. PROBLEMÁTICA DE LOS ENTEROCOCOS

II.4.2.1. ENTEROCOCOS COMO MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Durante mucho tiempo se consideró que los enterococos eran microorganismos comensales inofensivos con bajo potencial patógeno. No obstante, en los últimos años, el potencial patógeno de los

enterococos ha sido frecuentemente objeto de un gran debate debido a su presencia en infecciones nosocomiales, al aumento de sus resistencias a antibióticos y a su capacidad de intercambiar material genético con otras cepas de la misma especie, con especies del mismo género e, incluso, con especies de otros géneros bacterianos (sección II.4.2.2) (Murray, 1998; Cetinkaya *et al.*, 2000; Mundy *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Klare *et al.*, 2003; Klein, 2003; Koch *et al.*, 2004; Francia, 2005). En este contexto, en la actualidad, se considera que los enterococos son microorganismos patógenos humanos oportunistas emergentes que causan el 12% de las infecciones nosocomiales y que, por tanto, constituyen el segundo género con mayor importancia en las infecciones hospitalarias (Klare *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Klein, 2003). Asimismo, los enterococos son responsables de infecciones graves y con elevada mortalidad como bacteriemias, meningitis, septicemia, endocarditis e infecciones del tracto urinario, del sistema nervioso central, neonatales, cutáneas, de heridas quirúrgicas, pélvicas e intraabdominales (Franz *et al.*, 1999a, 2003; Kayser, 2003; Castro *et al.*, 2004; Ogier y Serror, 2008). Por su carácter de microorganismos oportunistas, los enterococos suelen causar infecciones en pacientes inmunodeprimidos, con enfermedades subyacentes, portadores de catéteres, sometidos a tratamientos con antibióticos, hospitalizados y/o que han permanecido en cuidados intensivos durante un largo periodo de tiempo (Morrison *et al.*, 1997; Kayser, 2003). En este sentido, la patogénesis de la mayoría de las infecciones producidas por los enterococos procede de acuerdo a una secuencia común de acontecimientos que comprende: (i) adherencia y colonización de los tejidos del hospedador, (ii) invasión del tejido y formación del absceso y (iii) resistencia a los mecanismos de defensa (inespecíficos y específicos) del hospedador. Posteriormente, el microorganismo patógeno debe producir cambios patológicos directamente por la producción de toxinas o indirectamente por la inflamación (Franz *et al.*, 1999a; Giraffa, 2002; Franz *et al.*, 2003). Los datos epidemiológicos indican que *E. faecalis* y *E. faecium* son responsables de la mayoría de las infecciones clínicas producidas por enterococos, siendo *E. faecalis* la especie predominante (80–90% de los casos) mientras que *E. faecium* es la causa de tan sólo un 5–15% de los casos (Klare *et al.*, 2001; Kayser, 2003). Sin embargo, recientemente también se han aislado cepas de *E. faecium* responsables de bacteriemias e infecciones pulmonares, probablemente como consecuencia del incremento en el número de aislados de esta especie resistentes a la vancomicina (VRE) (Mundy *et al.*, 2000; Vancanneyt *et al.*, 2002; Klare *et al.*, 2003; MacEachern *et al.*, 2005).

Por otra parte, el hecho de que los enterococos formen parte de la microflora intestinal habitual del hombre induce a pensar que su origen, en las infecciones, es la flora del paciente. Sin embargo, parece ser que la mayoría de las cepas aisladas han sido adquiridas exógenamente (de otros pacientes, de trabajadores del hospital o del ambiente hospitalario) y que, además, las cepas implicadas poseen generalmente uno o más factores de virulencia y/o resistencias a antibióticos (Kayser, 2003). En este contexto, el incremento del número de infecciones por enterococos, así como la aparición de cepas resistentes a uno o más antibióticos y su capacidad de transferir genes, ha provocado cierta inquietud sobre el riesgo para la salud humana que puede suponer su presencia en alimentos y preparaciones probióticas (Giraffa, 2002; Franz *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004). A este respecto, conviene destacar que, hasta el momento, no se ha podido demostrar que las cepas presentes en los alimentos puedan

ocasionar enfermedad en humanos (Adams, 1999). Además, estudios recientes indican que las cepas portadoras de factores de virulencia forman un grupo genómico diferente a la mayoría de las cepas aisladas de alimentos (Vancanneyt *et al.*, 2002). No obstante, antes de sugerir la utilización de una cepa de enterococo en la industria alimentaria y farmacéutica resulta necesario evaluar exhaustivamente su seguridad para el consumo humano, determinando la presencia/ausencia de factores de virulencia y evaluando la presencia de resistencias adquiridas a diversos antibióticos y su actividad hemolítica frente a eritrocitos humanos (Franz *et al.*, 1999a; Giraffa, 2002; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

II.4.2.2. PATOGENICIDAD DE LOS ENTEROCOCOS

Sorprendentemente todavía se conoce muy poco acerca de los principales factores que contribuyen a la habilidad de los enterococos de causar enfermedad en los humanos. No obstante, los enterococos no son intrínsecamente tan virulentos como otras bacterias patógenas Gram-positivas, ya que carecen de los potentes factores de virulencia encontrados comúnmente en estas últimas, sin embargo, poseen factores de virulencia específicos y otras características, como la resistencia a agentes antimicrobianos (detergentes, antisépticos y antibióticos), y la eficacia para adquirir y compartir material genético asociado a mayor virulencia y/o a multirresistencia, lo que contribuye a su virulencia y los convierte en efectivos microorganismos patógenos oportunistas (Franz *et al.*, 1999a; Garza-Velasco *et al.*, 2002; Giraffa, 2002; Koch *et al.*, 2004).

II.4.2.2.1. Resistencia a agentes antimicrobianos

Los enterococos, principalmente *E. faecium*, poseen un amplio espectro de resistencias naturales (intrínsecas) y adquiridas (transferibles) a antibióticos, además de su resistencia a diversos factores físico-químicos (por ej.: bajo pH, altas temperaturas y concentración de sal) y condiciones ambientales adversas (Eaton y Gasson, 2001; Klare *et al.*, 2001, 2003; Ogier y Serror, 2008). En este contexto, la supervivencia de los enterococos en el ambiente hospitalario está relacionada con: (i) su resistencia natural a diversos detergentes utilizados en la desinfección y diversos antibióticos de uso común en terapia humana y (ii) su capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos. Además, el incremento en el empleo de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de diversas infecciones provoca la selección de enterococos resistentes a antibióticos (ARE, del inglés *Antibiotic-Resistant Enterococci*), en algunos casos multirresistentes, y, por lo tanto, provoca un aumento en la incidencia de los enterococos en infecciones nosocomiales (Klare *et al.*, 2003).

De forma natural, los enterococos son resistentes a los siguientes antibióticos: (i) penicilinas semisintéticas resistentes a β -lactamasa; (ii) ácido nalidíxico; (iii) bajos niveles de aminoglucósidos; (iv) cefalosporinas; (v) estreptograminas (exclusivamente *E. faecalis*); (vi) fluoroquinolonas; (vii) bajos niveles de glicopéptidos (exclusivamente *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*); (viii) bajos niveles de lincosaminas; (ix) monobactams; (x) polimixinas y (xi) sulfonamidas (Witte *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2001, 2003; Marothi *et al.*, 2005). Por otra parte, los enterococos pueden adquirir resistencia a diversos antibióticos, tales como: (i) β lactámicos, (ii) ácido fusídico, (iii) altos niveles de aminoglucósidos, (iv) cloranfenicol, (v) estreptograminas, (vi)

evernimomicinas, (vii) glicopéptidos, (viii) lincosamidas, (ix) macrólidos, (x) nitrofurantoína, (xi) oxazolidinonas, (xii) quinolonas, (xiii) rifampicina, (xiv) tetraciclinas y (xv) trimetoprim (Witte *et al.*, 1999; Cetinkaya *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2001, 2003; Marothi *et al.*, 2005). A este respecto, los principales mecanismos de resistencia adquirida a antibióticos son la acumulación de mutación(es) en diversos genes cromosómicos y la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia conjugativa desde cepas donadoras, y ambos procesos son consecuencia de la intensa presión selectiva derivada del empleo de los antibióticos como agentes terapéuticos y profilácticos en medicina humana y veterinaria y como agentes promotores del crecimiento en producción animal (Klare *et al.*, 2001, 2003; Cocconcelli *et al.*, 2003).

Actualmente, los antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones clínicas causadas por enterococos resistentes a antibióticos son la ampicilina, la gentamicina y la vancomicina. Es importante recordar que el empleo extensivo de la vancomicina ha provocado un aumento de enterococos resistentes a este antibiótico (VRE). Hasta la fecha se han descrito seis fenotipos distintos de resistencia a vancomicina, cinco adquiridos y uno intrínseco o natural. VanA es el de mayor importancia clínica ya que se encuentra ampliamente distribuido en el género *Enterococcus*, principalmente en *E. faecium*, y confiere resistencia cruzada a la vancomicina, teicoplanina y avoparcina. VanB es el segundo en importancia y las cepas de este fenotipo muestran resistencia a niveles variables de vancomicina, pero todas ellas son susceptibles a la teicoplanina. VanC se localiza intrínsecamente en *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*, a los que confiere resistencia a bajos niveles de vancomicina. Finalmente, los fenotipos VanD, VanE y VanG son de menor relevancia clínica y sólo se han descrito en algunas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* (Franz *et al.*, 1999a; Klare *et al.*, 2001, 2003; Kayser, 2003; Ogier y Serror, 2008).

En Europa, los principales reservorios de enterococos VanA son los animales de explotación en los que el empleo durante varios años de avoparcina a dosis subterapéuticas, como aditivo antimicrobiano y promotor del crecimiento, ha contribuido a la aparición de VRE ya que la avoparcina confiere resistencia cruzada a la vancomicina (Wegener *et al.*, 1999; Cortés *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2007; Ogier y Serror, 2008). Por lo tanto, en Europa los VRE se encuentran distribuidos en animales a los que se les administró avoparcina como promotor del crecimiento, en el medio ambiente y/o en el tracto gastrointestinal de las personas sanas, no obstante, las infecciones con VRE son raras. Por el contrario en EE.UU., donde no se ha empleado avoparcina en alimentación animal, los VRE no se detectan en animales, en productos cárnicos derivados ni en individuos sanos (Hayes *et al.*, 2003). Sin embargo, el empleo continuado de vancomicina en la terapia humana ha favorecido la diseminación de los VRE en los ambientes hospitalarios, constituyendo dichos enterococos una de las principales causas de infección en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades subyacentes (Lund *et al.*, 2002; Kayser, 2003; Fernández *et al.*, 2006b; Ribeiro *et al.*, 2007).

Por otra parte, la presencia de enterococos resistentes a antibióticos es relativamente frecuente en los alimentos (Pavia *et al.*, 2000; del Campo *et al.*, 2001; Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Giraffa, 2002; de Vuyst *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Pérez-Pulido *et al.*, 2006), no obstante,

generalmente, estas cepas no presentan resistencia a los antibióticos de importancia clínica relevante, entre los que se incluyen la ampicilina, gentamicina, penicilina y vancomicina (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008). Además, conviene destacar que diversos autores han determinado que los enterococos de origen alimentario, principalmente de la especie *E. faecium*, muestran generalmente una sensibilidad a los antibióticos significativamente mayor que las cepas de origen clínico (Aguirre y Collins, 1993; Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; de Vuyst *et al.*, 2003; Mannu *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Busani *et al.*, 2004; Silva-Lopes *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006; McGowan *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007a; Ogier y Serror, 2008).

II.4.2.2. Factores de virulencia

En la actualidad, se conoce que los enterococos poseen diversos factores de virulencia específicos (moléculas efectoras que potencian la capacidad de un microorganismo de causar enfermedad) (Tabla II.9) que pueden estar asociados con una o varias de las etapas de la infección. La mayoría de los factores de virulencia descritos hasta la fecha son productos de secreción (por ej.: Cyl y la gelatinasa) o factores de adhesión (por ej.: sustancia de agregación y proteína de superficie de los enterococos) (Mundy *et al.*, 2000; Eaton y Gasson, 2001; Garza-Velasco *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Koch *et al.*, 2004; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008).

Tabla II.9. Principales factores potenciales de virulencia identificados en microorganismos del género *Enterococcus*

Gen(es)	Función(es) de las proteínas en la virulencia
<i>as</i>	Proteína de agregación involucrada en la adherencia a células eucariotas, agregación celular y conjugación
<i>gelE</i>	Metaloendopeptidasa extracelular que hidroliza la gelatina, el colágeno, la hemoglobina y otros compuestos bioactivos
<i>cylL_L</i> <i>cylL_S</i>	Precusores de la citolisina (Cyl). Para la producción de Cyl se requiere la expresión de los genes <i>cylL_L</i> , <i>cylL_S</i> , <i>cylM</i> , <i>cylB</i> y <i>cylA</i> . La molécula activa es capaz de lisar células eucariotas y bacterias Gram-positivas
<i>cylM</i>	Modificación postraduccional
<i>cylB</i>	Transporte de Cyl
<i>cylA</i>	Activación de Cyl
<i>cylI</i>	Inmunidad de Cyl
<i>cylR1</i> y <i>cylR2</i>	Regulación de Cyl
<i>esp</i>	Proteína asociada a la membrana celular relacionada con la evasión de la respuesta inmune
<i>efaA_{fs}</i> y <i>efaA_{fm}</i>	Adhesinas de la pared celular presentes en el suero de las personas portadoras de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> , respectivamente
<i>cpd</i> , <i>cob</i> , <i>cef</i> y <i>cad</i>	Feromonas sexuales implicadas en fenómenos de conjugación, que junto con las proteínas de exclusión superficial, poseen actividad quimiotáctica modulando la respuesta inmune

Adaptado de Eaton y Gasson (2001) y Martín (2006).

En la actualidad, se ha descrito la presencia de factores de virulencia en aislados clínicos y, en menor medida, en aislados de alimentos e, incluso, cepas empleadas como cultivos iniciadores en la industria alimentaria (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2003; Ogier y Serror, 2008). Asimismo, la presencia de factores de virulencia es mayor en aislados clínicos que en aislados fecales de individuos sanos. Por otra parte, las cepas de *E. faecalis* suelen poseer varios factores virulencia, mientras que las cepas de *E. faecium* suelen carecer de ellos, lo que puede deberse a la asociación de algunos de los factores de virulencia con plásmidos conjugativos de respuesta a feromonas, típicos de *E. faecalis*. No obstante, conviene destacar que la presencia de factores de virulencia depende específicamente de cada cepa (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001, 2003).

II.4.2.2.2.1. Adhesinas

La sustancia de agregación (AS, del inglés *Aggregation Substance*) es una adhesina superficial de naturaleza glicoproteica, codificada por plásmidos y exclusiva de *E. faecalis*, cuya producción es inducida por feromonas sexuales y ciertos factores séricos no identificados (Franz *et al.*, 2003). La adhesina AS se une a una sustancia complementaria presente en la superficie de las células receptoras, denominada sustancia de unión (EBS, del inglés *Enterococcal Binding Substance*), lo que provoca la formación de agregados entre células donadoras (portadoras del plásmido) y receptoras (carentes del plásmido) durante el proceso de conjugación bacteriana (Clewell, 1993a, b; Kayser *et al.*, 2003). Por otra parte, la adhesina AS posee un papel decisivo en la patogenia de los enterococos (adhesión e invasión) derivado de su capacidad de adhesión a células eucariotas (leucocitos y células epiteliales y endoteliales), a través de las integrinas, y a la matriz extracelular de diversos tejidos, a través de la fibronectina, la trombospodina, la vitronectina y el colágeno tipo I (Franz *et al.*, 2003). Además, la adhesina AS también promueve la adherencia, internalización y supervivencia de los enterococos en células del sistema inmune (macrófagos y neutrófilos) (Garza-Velasco *et al.*, 2002).

La proteína extracelular superficial (Esp, del inglés *Extracellular Surface Protein*) es una adhesina de naturaleza proteica, codificada por el cromosoma, implicada en la adherencia a los tejidos del hospedador y que, además, facilita la colonización y persistencia tisular, interviene en la evasión de la respuesta inmune y participa en la formación de “*biofilms*” (Franz *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2004).

A pesar de que las dos adhesinas mencionadas anteriormente son los factores de virulencia implicados en la adhesión al tejido del hospedador más importantes, se han descrito otras adhesinas como: (i) adhesina del colágeno (Ace, del inglés *Adhesin of Collagen from E. faecalis*), exclusiva de *E. faecalis*, que se une al colágeno y a la laminina (Franz *et al.*, 2003); (ii) adhesina EfaA_{fm} de *E. faecium* y (iii) adhesina EfaA_{fs} de *E. faecalis*, implicada presuntamente en la adhesión en procesos de endocarditis (Franz *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2004).

II.4.2.2.2.2. Citolisina o β -hemolisina/bacteriocina

Cyl o β -hemolisina/bacteriocina es una toxina celular cuya doble actividad biológica (hemolítica y bactericida) se debe a la acción conjunta de dos péptidos (CylL_L y CylL_S) y está codificada generalmente por plásmidos de respuesta a feromonas sexuales y, ocasionalmente, por el cromosoma. Para la producción de esta toxina es necesaria la expresión de ocho genes localizados en un único operón. Los genes *cylL_L* y *cylL_S* codifican dos precursores peptídicos, que son modificados postraduccionalmente por la proteína CylM. Posteriormente, CylB, un transportador del tipo ABC (sección II.5.1.1), se ocupa del transporte y secreción de ambas subunidades a través de la membrana celular y de eliminar la secuencia líder de cada una de ellas. A continuación, una serín-proteasa, codificada por *cylA*, elimina un fragmento de seis aminoácidos del extremo N-terminal de cada una de las subunidades, generando los dos péptidos activos. CylI es la proteína de inmunidad encargada de proteger a la célula productora de la actividad antimicrobiana de Cyl. Finalmente, la producción y secreción de Cyl se encuentra regulada por un mecanismo de regulación dependiente de la densidad celular (sistema *Quorum sensing*) en el que intervienen CylR1 y CylR2 (Franz *et al.*, 1999a; Kayser *et*

al., 2003; Shankar *et al.*, 2004). La toxina Cyl es el factor de virulencia más importante y está implicado en los siguientes procesos: (i) ruptura de las membranas celulares de bacterias Gram-positivas, eritrocitos y otras células eucariotas, (ii) toxicidad y letalidad de las infecciones, ya que favorece la aparición de los enterococos en el torrente sanguíneo y (iii) patogénesis en humanos, ya que su presencia se ha asociado con el incremento del riesgo de muerte (Garza-Velasco *et al.*, 2002; Coburn y Gilmore, 2003; Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003; Koch *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 2005).

II.4.2.2.2.3. Gelatinasa

La gelatinasa es una metaloendopeptidasa extracelular que hidroliza la gelatina, el colágeno, la hemoglobina y ciertos péptidos bioactivos, lo que induce a considerar que podría degradar las proteínas de la matriz extracelular y, por lo tanto, facilitar la invasión de los tejidos por los enterococos. Además, debido a su capacidad de degradar péptidos, influye en la cantidad de feromonas sexuales con actividad quimiotáctica producidas por *E. faecalis*, por lo que modula la respuesta defensiva del hospedador induciendo alternativamente la ausencia y la acumulación de leucocitos. Por otra parte, la gelatinasa podría contribuir a la virulencia, ya que su producción es un rasgo fenotípico característico de los enterococos aislados de pacientes infectados, si bien, hasta la fecha, los estudios epidemiológicos realizados únicamente han sugerido la asociación entre su producción y la virulencia de los enterococos (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003).

II.4.2.2.2.4. Feromonas sexuales y proteína de exclusión superficial

Las feromonas sexuales (implicadas en el proceso de conjugación bacteriana exclusivo de los plásmidos que responden a estas sustancias), junto con las proteínas de exclusión superficial (encargadas de evitar procesos de conjugación redundantes entre células donadoras) poseen actividad quimiotáctica, por lo que modulan la respuesta inmune, e inducen la producción de superóxido por los neutrófilos y la secreción de enzimas lisosomales (Witte *et al.*, 1999; Klare *et al.*, 2001; Chandler y Dunny, 2004).

II.4.2.2.2.5. Hialuronidasa

La hialuronidasa es una enzima asociada a la superficie celular que degrada el componente mucopolisacárido del tejido conectivo y del cartílago (Witte *et al.*, 1999). A pesar de que no se ha demostrado su papel directo en la patogénesis de los enterococos, la comparación con otros microorganismos patógenos permite especular que esta enzima también puede tener un papel en la virulencia de los enterococos contribuyendo a su diseminación por el tejido conectivo (Jett *et al.*, 1994; Mundy *et al.*, 2000; Klare *et al.*, 2001; Kayser, 2003).

II.4.2.2.2.6. Producción de superóxido

Un gran número de cepas de *E. faecalis*, aunque sólo unas pocas de *E. faecium*, producen superóxido extracelular y su producción es mayor en las cepas de enterococos de origen clínico que en el resto de cepas. Este compuesto parece ejercer un fuerte estrés oxidativo en el epitelio intestinal y, además, podría estar implicado en los procesos de translocación a través del mismo y/o en la

inestabilidad cromosómica asociada a pólipos intestinales y cáncer colorrectal (Mundy *et al.*, 2000; Kayser, 2003; Fernández *et al.*, 2006b).

II.4.2.2.2.7. Ácido lipoteicoico

El ácido lipoteicoico de la pared celular modula la respuesta inmune, induciendo la producción de interleuquinas y del factor de necrosis tumoral (TNF- α , del inglés *Tumour Necrosis Factor*), y facilita la transferencia conjugativa de los plásmidos de respuesta a feromonas sexuales (Klare *et al.*, 2001).

II.4.2.2.3. Mecanismos de intercambio de material genético

Como se mencionó anteriormente, los enterococos disponen de varios sistemas que les permiten intercambiar material genético con cepas de la misma especie, con especies del mismo género e, incluso, con especies de otros géneros bacterianos. Así pues, hasta la fecha, se han descrito diferentes mecanismos de transferencia genética mediante diversos elementos genéticos móviles (plásmidos conjugativos, plásmidos movilizables y transposones conjugativos), que generalmente contienen genes que codifican factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos (Franz *et al.*, 1999a; Castro *et al.*, 2004). A este respecto, existe actualmente una gran controversia acerca del riesgo potencial de la presencia de enterococos en alimentos y preparaciones probióticas debido a la posibilidad de transferencia de los genes de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos entre las cepas de enterococos ingeridas con los alimentos y las que forman parte de la microbiota intestinal habitual (Franz *et al.*, 2003; Mathur y Singh, 2005; Hummel *et al.*, 2007a). A esto también contribuye el hecho de que diversos investigadores han demostrado: (i) la transferencia *in vitro* de un plásmido de respuesta a feromonas de *E. faecalis*, que codifica diversos factores de virulencia, a cepas de esta especie, pero no de *E. faecium*, empleadas como cultivos iniciadores (Eaton y Gasson, 2001); (ii) la transferencia *in vitro* de genes que confieren resistencia a vancomicina a cepas de *E. faecium* empleadas como cultivos probióticos en nutrición animal, pero a un ritmo menor que a una cepa control de esta especie de origen clínico (Klein y Pack, 1997); (iii) la transferencia *in vivo* (en el tracto gastrointestinal de animales de experimentación) de un transposón conjugativo de *E. faecalis*, que confiere resistencia a antibióticos, a cepas de *E. coli* y *L. monocytogenes* (Doucet-Populaire *et al.*, 1991); (iv) la transferencia *in vivo* de un transposón conjugativo de *E. faecium*, que confiere resistencia a antibióticos, a otra cepa de *E. faecium* (Lester *et al.*, 2004); (v) la transferencia *in vivo* de un plásmido de respuesta a feromonas de *E. faecalis*, que codifica factores de virulencia y de resistencia a antibióticos, en ausencia de presión selectiva a otras cepas de esta especie (Huycke *et al.*, 1992; Licht *et al.*, 2002); (vi) la transferencia, durante la fermentación de alimentos, de un plásmido de respuesta a feromonas de *E. faecalis*, que codifica factores de resistencia a antibióticos, a otra cepa de esta especie de origen alimentario (Cocconcelli *et al.*, 2003) y, por último, la existencia de (vii) patrones electroforéticos similares en cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina aisladas de cerdos y pacientes hospitalizados en Dinamarca (Jensen *et al.*, 1999) y (viii) patrones electroforéticos similares en cepas de *E. faecium* aisladas de cerdos con un cuadro de choque hemorrágico y de granjeros con una sintomatología similar (Lu *et al.*, 2002).

II.4.3. IMPORTANCIA DE LOS ENTEROCOCOS EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIA Y FARMACÉUTICA

II.4.3.1. ENTEROCOCOS Y ALIMENTOS

Debido a su ubicuidad y adaptabilidad (sección II.4.1), los enterococos procedentes del tracto gastrointestinal y del medio ambiente pueden contaminar y colonizar los alimentos crudos (por ej.: carne, leche y vegetales) y desarrollarse y multiplicarse durante su fermentación (Samelis *et al.*, 1998; Giraffa, 2003; Comi *et al.*, 2005; Drosinos *et al.*, 2005). Además, también pueden contaminar alimentos elaborados durante su manipulación (Giraffa, 2003). Por consiguiente, se han aislado enterococos, principalmente *E. faecium*, de una gran variedad de alimentos, tales como: (i) leche y productos lácteos fermentados (Ennahar *et al.*, 1998; Andrighetto *et al.*, 2001; Gelsomino *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2003; Alvarado *et al.*, 2005; Citti, 2005; Majhenič *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Madrau *et al.*, 2006; Morandi *et al.*, 2006; Psoni *et al.*, 2006); (ii) carne, embutidos crudos curados y carnes envasadas y tratadas térmicamente (Cintas *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998; Samelis *et al.*, 1998; Herranz *et al.*, 1999, 2001c; Hugas *et al.*, 2003; Papamanoli *et al.*, 2003; Björkroth *et al.*, 2005; Comi *et al.*, 2005; Drosinos *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2005; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006, 2007b); (iii) vegetales, derivados vegetales fermentados y ensilados (Ohmomo *et al.*, 2000; Eguchi *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003; de Kwaadsteniet *et al.*, 2005; Yousif *et al.*, 2005; Zendo *et al.*, 2005; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Sparo *et al.*, 2006); (iv) aceitunas y encurtidos (Franz *et al.*, 1996; Bennick *et al.*, 1998; Floriano *et al.*, 1998; Todorov y Dicks, 2005; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006) y (v) pescado y productos derivados (Ben Embarek *et al.*, 1994; Gómez *et al.*, 2004a, b; Campos *et al.*, 2006).

II.4.3.1.1. Presencia natural de enterococos en leche y productos lácteos

Los enterococos pueden estar presentes en los productos lácteos debido a unas inadecuadas condiciones higiénico-sanitarias durante la producción y procesamiento de la leche. A este respecto, los enterococos pueden llegar a la leche directamente a través de contaminación fecal o indirectamente a través de aguas contaminadas, la superficie externa de los animales y/o equipos de ordeño y el almacenamiento de la leche. Por otra parte, debido a su naturaleza psicotrópica, su resistencia a los tratamientos térmicos y su adaptabilidad a diferentes sustratos y condiciones de crecimiento, los enterococos pueden desarrollarse en leche refrigerada y sobrevivir después de la pasteurización (Giraffa, 2003). Por lo tanto, los enterococos, principalmente *E. faecium* y *E. faecalis*, forman parte de la microflora habitual de la leche cruda y pasteurizada (Franz *et al.*, 1999a; Gelsonimo *et al.*, 2001; Giraffa, 2003). Estos microorganismos forman parte de los cultivos iniciadores naturales empleados en la producción de quesos artesanos a partir de leche cruda o pasteurizada, y obtenidos a partir de leche cruda o suero lácteo con una adecuada calidad higiénica mediante tratamientos térmicos (pasteurización y, posteriormente, incubación a 42–44°C durante 12–15 h) que promueven la selección natural de bacterias lácticas termófilas y termorresistentes (por ej: *Streptococcus thermophilus* y *Enterococcus* spp.) presentes de forma natural en estos sustratos (Giraffa, 2003).

Por otra parte, los enterococos forman parte de la flora NSLAB final de muchos quesos artesanales europeos elaborados con leche cruda o pasteurizada, en los que el nivel al que persisten depende de muchos factores (por ej.: grado de contaminación de la leche, tipo de queso, temporada del año de producción, tipo de cultivo iniciador empleado y tecnología aplicada) (Giraffa, 2003). Es importante destacar que su presencia a niveles elevados en quesos industriales frescos o de pasta blanda elaborados con leche pasteurizada y cultivos iniciadores seleccionados es indeseable, ya que conduce al deterioro de las características sensoriales de estos productos (Giraffa *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999a; Giraffa, 2003). No obstante, numerosos estudios han demostrado que los enterococos pueden tener una influencia positiva en la producción y maduración de diversos quesos (por ej.: “Manchego”, “Armada”, “Cebreiro”, “Picante”, “Majorero”, “Feta”, “Teleme”, “Mozzarella”, “Monte Veronese”, “Fontina”, “Caprino”, “Serra”, “Venaco” y “Comté”), en los que pueden constituir la microflora principal de la cuajada fresca (10^4 – 10^6 ufc/g) e, incluso, del producto final (10^5 – 10^7 ufc/g), siendo *E. faecium*, *E. faecalis* y *Enterococcus durans* las especies más frecuentes (Giraffa *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999a; Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003; Ogier y Serror, 2008).

En lo que respecta a su papel en este tipo de alimentos, conviene destacar que los enterococos poseen ciertas actividades metabólicas (por ej.: actividades acidificante, proteolítica, lipolítica y esterásica y capacidad de metabolizar el citrato y el piruvato) (sección II.4.3.1.4) que contribuyen de forma positiva al desarrollo de características organolépticas deseables (sabor, textura y aroma) durante la maduración de diversos quesos. Además, numerosas cepas de enterococos producen bacteriocinas con actividad antimicrobiana anti-*Listeria* (sección II.4.4), lo que podría contribuir a la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos en los que se encuentren. Así pues, debido al interés tecnológico de estas propiedades bioquímicas, determinadas cepas de *E. faecium* y, en algunos casos, *E. faecalis* forman o podrían formar parte de los cultivos iniciadores y/o adjuntos empleados en la elaboración de diversos quesos (sección II.4.3.1.4) (ACNFP, 1996; Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.* 2006).

II.4.3.1.2. Presencia natural de enterococos en carne y productos cárnicos

La presencia de enterococos en el tracto gastrointestinal de los animales puede conducir a una alta contaminación de la canal (10^2 – 10^4 ufc/g) durante su sacrificio. Por otra parte, se ha descrito la presencia de enterococos en carnes tratadas térmicamente y envasadas (procesadas), ya que, debido a su termorresistencia, los enterococos resisten los tratamientos de calentamiento aplicados durante la elaboración de estos productos. Por otra parte, debido a su tolerancia a la sal y a su capacidad de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas, los enterococos, principalmente *E. faecium* y *E. faecalis*, aparecen también a niveles elevados (10^2 – $2,6 \times 10^5$ ufc/g) en embutidos fermentados (por ej.: salami, chorizo y fuet), pudiendo contribuir al desarrollo de la fermentación junto con los lactobacilos (Giraffa, 2002; Franz *et al.*, 2003; Hugas *et al.*, 2003).

A pesar de que no se ha estudiado exhaustivamente su papel en los embutidos fermentados, se ha sugerido que los enterococos pueden contribuir al: (i) desarrollo del aroma del producto final como consecuencia de sus actividades glicolítica, proteolítica y lipolítica, (ii) mantenimiento del color rojo de la carne fresca debido a su actividad reductora de la metamioglobina e (iii) incremento de la seguridad

higiénica debido a la producción de bacteriocinas con actividad anti-*Listeria* (Franz *et al.*, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.* 2006).

II.4.3.1.3. Presencia natural de enterococos en vegetales

Los enterococos de forma natural se encuentran en gran número en vegetales, así pues, existen diversos estudios en los que se han aislado enterococos de aceitunas verdes estilo español, aceitunas verdes fermentadas de Sicilia, aceitunas negras, alubias, frutas, cebada, sorgo y soja (Franz *et al.*, 1996; Floriano *et al.*, 1998; O'Mahony *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2001; Hartnett *et al.*, 2002; de Castro *et al.*, 2002; Ben Omar *et al.*, 2004; Randazzo *et al.*, 2004; Todorov *et al.*, 2005; Todorov y Dicks, 2005; Zendo *et al.*, 2005; McGowan *et al.*, 2006). Estos enterococos pertenecen principalmente a la especie *E. faecium*, aunque también se aislaron cepas de *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. hirae* *E.* y *mundtii*. Asimismo, se han aislado 22 cepas de *E. faecium* de “hussuwa”, un alimento de sorgo fermentado típico de Sudán (Yousif *et al.*, 2005).

II.4.3.1.4. Enterococos como cultivos iniciadores, protectores y adjuntos

De forma general, los enterococos influyen positivamente en la producción y maduración de los alimentos fermentados, ya que contribuyen al desarrollo de sus características organolépticas específicas (sabor y aroma) con sus metabolitos (primarios y secundarios) y con las enzimas que producen, que interactúan con los componentes de la materia prima. Las actividades metabólicas de los enterococos de interés tecnológico, principalmente en lo que respecta a la elaboración de quesos, son las siguientes:

1. Actividad acidificante. Esta actividad metabólica resulta esencial durante la fabricación de quesos para la coagulación de la leche, acidificación de la cuajada y reducción/prevenición del crecimiento de la flora adventicia (Sarantinopoulos *et al.*, 2001). No obstante, los enterococos poseen generalmente una baja capacidad acidificante tanto en leche (Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003) como en carne (Aymerich *et al.*, 2000a; Hugas *et al.*, 2003), siendo ésta mayor en *E. faecalis* que en *E. faecium* y *E. durans* (Giraffa, 2003).
2. Actividad proteolítica y peptidásica. Estas actividades metabólicas resultan también esenciales durante la maduración de los quesos, no sólo por la contribución de la degradación de la caseína al desarrollo de la textura, sino también porque los péptidos generados contribuyen al desarrollo del aroma y del sabor durante la maduración. No obstante, de forma general, la actividad proteolítica y peptidásica de los enterococos es reducida también, siendo ésta mayor en *E. faecalis* que en *E. faecium* (Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).
3. Actividad lipolítica y esterásica. La contribución de estas actividades metabólicas durante la maduración de los quesos no es bien conocida, no obstante, la actividad esterásica influye en el desarrollo del sabor y la textura del queso. A este respecto, los enterococos son las bacterias lácticas que muestran mayor actividad esterásica, siendo ésta mayor en *E. faecium* que en *E. faecalis*. Por otra parte, aunque la actividad lipolítica no está relacionada directamente con el desarrollo de las características reológicas de los quesos, genera diglicéridos y monoglicéridos que influyen en su textura (Giraffa, 2003). Además, la actividad lipolítica de los enterococos depende

- de la cepa, siendo ésta mayor en *E. faecalis* que en *E. faecium* (Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.* 2006).
4. Metabolismo del citrato y del piruvato. A partir de estas actividades metabólicas, máximas cuando los enterococos se desarrollan en leche, se generan compuestos relacionados con el desarrollo del aroma y sabor de los quesos (por ej.: acetaldehído, diacetilo y acetoina), así como con la textura de determinados productos lácteos fermentados (por ej.: dióxido de carbono). Estas actividades metabólicas son superiores en *E. durans* que en *E. faecalis* y *E. faecium* (Giraffa, 2003).
 5. Metabolismo de azúcares galactósidos α . Se ha descrito que algunos enterococos aislados de productos vegetales fermentados africanos son capaces de metabolizar los azúcares galactósidos α , que son indigestibles y, por lo tanto, antinutritivos, lo que constituye una actividad metabólica interesante para la elaboración de este tipo de alimentos ya que disminuyen la concentración de estos azúcares antinutritivos y mejoran la seguridad del producto (Yousif *et al.*, 2005).

Conviene destacar que la baja capacidad acidificante de los enterococos limita su empleo como cultivos iniciadores primarios para la elaboración de quesos, pero no como cultivos adjuntos (Anónimo, 2001). Así pues, se ha propuesto la utilización de enterococos, principalmente *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans*, en combinación con otras bacterias lácticas mesófilas y termófilas, como parte de cultivos iniciadores definidos para la elaboración de queso “Mozzarella”, “Feta”, “Venaco”, “Cebreiro”, “Hispanico” y “Cheddar”. Los resultados obtenidos demuestran que estos enterococos desempeñan un papel beneficioso durante la maduración y en las características organolépticas de los quesos (Anónimo, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Giraffa, 2003). Además, algunas cepas de *E. faecium*, como *E. faecium* K77D, están autorizadas como cultivos iniciadores para la elaboración de productos lácteos por el “UK Advisory Committee on Novel Foods and Processes” (ACNFP; Londres, Reino Unido) (ACNFP, 1996), y otras se emplean habitualmente como cultivos iniciadores o probióticos en diversos países ya que están autorizadas por la “International Dairy Federation” (IDF; Nottingham, Reino Unido) (Hugas *et al.*, 2003; Citti, 2005; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Por otra parte, con respecto al empleo de enterococos como cultivos iniciadores de los derivados cárnicos, Aymerich *et al.* (2000b) demostraron que las cepas aisladas de carne pueden ser muy competitivas, siendo capaces de dirigir la fermentación y llegar a constituir la totalidad de la flora láctica en el producto cárnico fermentado final (Hugas *et al.*, 2003).

Por otra parte, los enterococos podrían emplearse como cultivos protectores debido a su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y alterantes presentes en los alimentos (por ej.: *Listeria* spp.), debido principalmente a la producción de bacteriocinas (enterocinas) (sección II.4.4) (Franz *et al.*, 2003; Giraffa, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). En este contexto, numerosos estudios han demostrado la producción *in situ* de enterocinas durante la elaboración de queso y su estabilidad durante su maduración (Tabla II.10), así como su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y alterantes presentes en los alimentos (por ej.: *Listeria* spp.) (sección II.3.4.10) (Giraffa *et al.*, 1995; Oumer *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003a, 2006). Asimismo, aunque no se han realizado tantos estudios en productos cárnicos, se ha demostrado su utilidad como cultivos adjuntos y/o protectores de determinados productos cárnicos fermentados

(sección II.3.4.10) (Callewaert *et al.*, 2000; Foulquié-Moreno *et al.* 2006). No obstante, la funcionalidad de las cepas bacteriocinogénicas bajo las condiciones de elaboración industrial de estos productos está influida notablemente por el tipo de alimento y la tecnología aplicada (Giraffa, 2003; Hugas *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

En definitiva, teniendo en cuenta, por una parte, los numerosos estudios que han demostrado la eficacia de los enterococos bacteriocinogénicos como cultivos iniciadores, adjuntos y/o protectores de los alimentos (Tabla II.10) y, por otra parte, que la IDF ha aceptado el empleo de algunos aislados de *E. faecium* como cultivos iniciadores y/o protectores seguros, la utilización de enterococos bacteriocinogénicos podría generalizarse para la elaboración de diversos productos lácteos, quesos principalmente, ya que resultan útiles como potentes agentes anti-*Listeria* y para evitar la hinchazón tardía producida por el crecimiento de *Cl. tyrobutyricum* en quesos envasados (Giraffa, 1995; Giraffa *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999a; Anónimo, 2001; Martínez *et al.*, 2003). Asimismo, es posible que los enterococos bacteriocinogénicos, una vez evaluada exhaustivamente la seguridad de la cepa concreta a emplear (sección II.4.3.3.4), tengan una aplicación tecnológica en otros alimentos (por ej.: productos cárnicos fermentados, pescados, vegetales, encurtidos y ensilados), en los que también se ha descrito su presencia (Franz *et al.*, 1999a; Martínez *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004).

Tabla II.10. Aplicaciones de los enterococos bacteriocinogénicos como cultivos iniciadores, adjuntos y/o protectores de los alimentos

Especie y cepa	Enterocina producida	Aplicación
<i>E. casseliflavus</i> cc45	- ^b	Fermentación de aceitunas verdes estilo español
<i>E. casseliflavus</i> IM 416K1	Enterocin 416K1	“Cacciatore” (embutido fermentado)
<i>E. faecalis</i> A-48-32	Enterocina AS-48	Sistemas cárnicos modelo
<i>E. faecalis</i> TAB 28	Enterocina AS-48	Queso de leche cruda
<i>E. faecium</i> 7C5	Enterocina AS-48	Queso “Taleggio”
<i>E. faecium</i> BFE 900-a	Enterocinas A y B	Tofu
<i>E. faecium</i> CCM 4231	Enterocina A	Embutidos fermentados, queso “Saint-Paulin” y “leche” de soja
<i>E. faecium</i> CRL35	Enterocina CRL35	Queso de cabra y sistemas cárnicos modelo
<i>E. faecium</i> CTC 492	Enterocinas A y B	Carne de cerdo tratada térmicamente y embutidos fermentados ^a
<i>E. faecium</i> DPC 1146	Enterocina A	Queso “Cheddar”
<i>E. faecium</i> FAIR-E 198	Enterocinas A y/o P	Queso “Feta”
<i>E. faecium</i> INIA 4	Enterocina AS-48	Queso “Manchego” e “Hispanico”
<i>E. faecium</i> RZS C13	Enterocina B	Embutidos fermentados
<i>E. faecium</i> RZS C5	Enterocina B	Queso “Cheddar”

^aEsta aplicación únicamente fue útil cuando se empleó el cultivo de esta cepa conjuntamente con sus enterocinas semipurificadas.

^bNo descrita/conocida. Adaptado de Foulquié-Moreno *et al.* (2006) y Criado (2006).

II.4.3.2. ENTEROCOCOS Y SALUD: ENTEROCOCOS COMO CULTIVOS PROBIÓTICOS

A pesar de que los productos probióticos empleados en alimentación humana y animal contienen generalmente *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., ocasionalmente se ha descrito la presencia de cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* (Franz *et al.*, 1999a; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Yermolenko *et al.*, 2006). A este respecto, entre los productos probióticos para alimentación humana que contienen *E. faecium* se incluyen Causido[®], Ecoflor[®], Gaio[®], Lacto-Sacc[®], Paraghurt[®], Aciforce[®] y Novaflora[®], en los que se reseña su presencia en la etiqueta, y *Bifidus complex*[®], *Prévite acidophilus*[®] y *Psyllium*[®], en los que no se menciona la presencia de estos microorganismos (Anónimo, 2002; Temmerman *et al.*, 2003). En particular, la cepa probiótica *E. faecium* SF68 tiene una larga historia de empleo seguro en el

tratamiento de la diarrea en niños y adultos, como alternativa a la administración de antibióticos, debido a que disminuye los días de duración de este proceso y el número de deposiciones del paciente. Asimismo, esta cepa previene la incidencia de diarrea y mucositis oral, como consecuencia de una deficiencia de vitaminas, en pacientes con tuberculosis pulmonar crónica (Franz *et al.*, 1999a; Anónimo, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008). Por otra parte, se ha sugerido su empleo para reducir el nivel sanguíneo de amonio y mejorar así el estado mental de pacientes con encefalopatía hepática. Además, *E. faecium* SF68 disminuye los niveles de colesterol en sangre cuando se consume durante cortos periodos de tiempo y destaca por su utilidad para la elaboración de productos cárnicos fermentados funcionales (Franz *et al.*, 1999a; Anónimo, 2002; Hugas *et al.*, 2003). Además de *E. faecium* SF68, existen otras cepas con actividad probiótica en alimentación humana, entre las que destacan: (i) *E. faecium* CRL 183, que se emplea como producto fermentado de “leche” de soja en combinación con *Lactobacillus jugurti* provocando una disminución del colesterol, (ii) *E. faecium* PR88, que provoca una mejora de los síntomas del síndrome de colón irritable y (iii) una cepa de *E. faecium* comercializada en los Países Bajos, que se caracteriza por su eficacia frente a la diarrea, sus efectos anticarcinogénicos, la producción de una enterocina activa frente a *L. monocytogenes* y la disminución de los niveles de colesterol en sangre (Anónimo, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Por otra parte, en producción animal se ha autorizado el empleo de nueve cepas de *E. faecium* como cultivos probióticos para la prevención y el tratamiento de enfermedades intestinales y como promotores del crecimiento, como alternativa al tratamiento con antibióticos y con el objeto de evitar el desarrollo de microorganismos patógenos resistentes a estas sustancias y su diseminación a partir de alimentos de origen animal (Anónimo, 2002; Becquet, 2003). En este sentido, *E. faecium* SF68 puede emplearse en la alimentación de cerdos, para prevenir o tratar la diarrea producida por *E. coli*, y de perros, ya que aumenta significativamente la respuesta inmune humoral y la mediada por células (Franz *et al.*, 1999a; Benyacoub *et al.*, 2003). Además, esta cepa puede utilizarse en la alimentación de pollos, cerdos y ganado vacuno, así como en la alimentación de lechones y terneros durante los cuatro y seis primeros meses de vida, respectivamente (Becquet, 2003; Vahjen *et al.*, 2007).

II.4.3.3. ASPECTOS NEGATIVOS DE LA PRESENCIA DE ENTEROCOCOS EN LOS ALIMENTOS

II.4.3.3.1. Enterococos como microorganismos indicadores de contaminación fecal

Tradicionalmente, se ha considerado que los enterococos son microorganismos indicadores de contaminación fecal y de una deficiente calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, ya que su principal hábitat es el tracto gastrointestinal de los mamíferos, son termorresistentes y poseen la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas (Leclerc *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1999a). A este respecto, incluso en la actualidad se considera que los enterococos son los indicadores más apropiados para evaluar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos sometidos a un tratamiento térmico suave o de congelación, ya que resisten mejor estos tratamientos que los coliformes (Martínez *et al.*, 2003). Sin embargo, su capacidad de sobrevivir en ambientes extraintestinales y su elevada termorresistencia los convierte en microorganismos muy ubicuos, lo que hace que la validez de su

consideración como indicadores de contaminación fecal sea limitada (Giraffa *et al.*, 1997; Stiles y Holzapfel, 1997).

II.4.3.3.2. Enterococos como microorganismos alterantes de los alimentos

En ocasiones, se ha descrito que los enterococos, particularmente *E. faecium* y *E. faecalis*, son microorganismos alterantes (sección II.3.3.1.1) de las carnes tratadas térmicamente y envasadas (procesadas), en los que aparecen como supervivientes del proceso de pasteurización o como consecuencia de contaminaciones cruzadas durante las últimas etapas de su elaboración (loncheado y empaquetado) (Magnus *et al.*, 1986; Franz *et al.*, 1999a, 2003; Hugas *et al.*, 2003).

II.4.3.3.3. Enterococos como microorganismos productores de aminas biógenas

Se ha demostrado que algunos enterococos aislados de alimentos fermentados producen aminas biógenas (sección II.3.3.1.1), principalmente tiramina e histamina (Bover-Cid *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2001). Sin embargo, en embutidos fermentados artesanales no se ha demostrado que exista una relación directa entre el contenido en aminas biógenas y el número de enterococos presentes (Giraffa, 2002; Hugas *et al.*, 2003; Ogier y Serror, 2008).

II.4.3.3.4. Enterococos como microorganismos patógenos

Actualmente, los enterococos no son considerados como microorganismos GRAS y/o QPS debido a su asociación con infecciones clínicas (patógenos oportunistas) y a sus características intrínsecas (resistencia a antibióticos, factores de virulencia y mecanismos de transferencia genética) (sección II.4.2.2) (Anónimo, 2001). Asimismo, su presencia en los alimentos es, a veces, causa de preocupación para la industria alimentaria y los consumidores e, incluso, existe una controversia creciente e incesante sobre su utilización en las industrias alimentaria y farmacéutica como cultivos iniciadores y probióticos, respectivamente. No obstante, debe destacarse que: (i) hasta el momento, no se ha podido demostrar que cepas presentes en los alimentos puedan ocasionar enfermedad en humanos y animales (Adams, 1999) y, además, (ii) el consumo durante siglos de alimentos fermentados tradicionales que contienen enterococos de forma natural no ha causado aparentemente ningún problema de salud (Giraffa, 1995; Giraffa *et al.*, 1997; Eaton y Gasson, 2001). Por todo ello, se ha sugerido que el empleo de cepas de origen alimentario no supone ningún riesgo para la salud humana (Giraffa, 1995; Giraffa *et al.*, 1997; Eaton y Gasson, 2001) e, incluso, como se mencionó anteriormente (sección II.4.3.1.4), se ha descrito que los enterococos pueden tener un efecto positivo en las características organolépticas de diversos alimentos. En cualquier caso, antes de introducir nuevas cepas como cultivos iniciadores, protectores, adjuntos y/o probióticos debe confirmarse previamente, y de forma muy rigurosa, la inocuidad y seguridad para el consumo humano de dichas cepas (carencia de factores de virulencia y susceptibilidad a antibióticos de interés clínico) (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Ben Omar *et al.*, 2004; Hummel *et al.*, 2007a). Sin embargo, a pesar de todo ello, no puede descartarse la posibilidad de que los enterococos presentes en los alimentos pudieran adquirir genes de factores de virulencia y resistencia a antibióticos gracias a sus mecanismos de transferencia genética (Franz *et al.*, 2003). Por todo ello, la clonación de los genes necesarios para la producción y secreción de enterocinas

de interés para la industria alimentaria en bacterias lácticas, mohos o levaduras con *status* GRAS o QPS empleadas en la elaboración de alimentos y bebidas (por ej.: *Lc. lactis*, *St. thermophilus*, *Lactobacillus* spp., *Penicillium* spp. y *Sc. cerevisiae*), permitiría obtener microorganismos recombinantes productores de las enterocinas de interés de gran utilidad en la moderna y futura industria alimentaria.

II.4.4. BACTERIOCINAS (ENTEROCINAS) PRODUCIDAS POR MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *Enterococcus*

Hasta la fecha, se han aislado numerosas cepas de enterococos productores de enterocinas, principalmente *E. faecium* y *E. faecalis* y, en menor medida, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *Enterococcus columbae*, *E. durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae* y *E. mundtii*, a partir de una gran variedad de alimentos, entre los que se incluyen leche, productos lácteos, carne y animales de granja y caza (por ej.: pollos, patos y palomas), embutidos crudos curados y otros productos cárnicos fermentados, vegetales frescos y fermentados, pescados, mariscos y derivados de la pesca (Tabla II.11) (Cintas *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 1996; Franz *et al.*, 1996; Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 1998; Floriano *et al.*, 1998; Herranz *et al.*, 1999, 2001c; Moreno *et al.*, 2002; Sabia *et al.*, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b; Nilsen *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2004a, b; Achemchem *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 2005; Citti, 2005; de Kwaadsteneid *et al.*, 2005; Todorov *et al.*, 2005; Todorov y Dicks, 2005; Zendo *et al.*, 2005; Abriouel *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2006; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006, 2007b; Cocolin *et al.*, 2007; Dimov, 2007; Nes *et al.*, 2007), por lo que la bacteriocinogenicidad constituye un rasgo fenotípico muy común entre los enterococos de origen alimentario. Asimismo, se han aislado enterococos productores de enterocinas de preparaciones probióticas (Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b; Yermolenko *et al.*, 2006), agua (Gálvez *et al.*, 1998; Švec *et al.*, 2001), leche materna (Martín, 2005; Fernández *et al.*, 2006a), heces humanas (Kang y Lee, 2005; Nes *et al.*, 2005), heces animales (Balla *et al.*, 2000; du Toit *et al.*, 2000; Jennes *et al.*, 2000; Mareková *et al.*, 2003; Poeta *et al.*, 2006, 2007; Simonová y Lauková, 2007), ensilados (Ohmomo *et al.*, 2000; Eguchi *et al.*, 2001; Sparo *et al.*, 2006), “pan de abeja” (Audisio *et al.*, 2005), suelo (Yanagida *et al.*, 2005), purines (Lauková *et al.*, 1998b), glándula uropigial de abubilla (Martín-Platero *et al.*, 2006), rumen (Nigutova *et al.*, 2007) y muestras clínicas (del Campo *et al.*, 2001; Tomita e Ike, 2005; de Kwaadsteniet *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2006) (Tabla II.11).

De forma general, el espectro de actividad antimicrobiana de las enterocinas es amplio e incluye microorganismos patógenos, como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Cl. botulinum* y *Cl. perfringens*, y microorganismos alterantes, como *Cl. tyrobutyricum*, además de otros enterococos y bacterias lácticas (Giraffa *et al.*, 1995; 1997; Franz *et al.*, 1999a; Cintas *et al.*, 2001; Giraffa, 2003; Martínez *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007). Además, aunque generalmente las bacteriocinas son sólo activas frente a bacterias Gram-positivas (sección II.3.4.3), se ha descrito que la bacteriocina A5-11 (A y B) (Batdorj *et al.*, 2006), enterocina 012 (Jennes *et al.*, 2000), EntAS-48 (Gálvez *et al.*, 1989),

Tabla II.11. Bacteriocinas producidas por *Enterococcus* spp.

Clase	Bacteriocina	Subclase	Especie y cepa productora	Fuente	Referencia original
Clase I	Citolisina (CylL _L y CylL _S) Columbicina A	Ia2 _{-h}	<i>E. faecalis</i> <i>E. columbae</i> PLCH2	Aislado clínico Animal de caza (paloma)	Gilmore <i>et al.</i> (1994) Martín <i>et al.</i> (2003)
Clase II	Bacteriocina 32 Bacteriocina 43 Bacteriocina T8	IIa - IIa	<i>E. faecium</i> VRE200 <i>E. faecium</i> VRE82 <i>E. faecium</i> T8	Aislado clínico Aislado clínico Aislado clínico	Inoue <i>et al.</i> (2006) Todokoro <i>et al.</i> (2006) de Kwaadsteniet <i>et al.</i> (2006)
	Durancina L28-1B Enterocina 012 Enterocina 1071 ^a (Ent1071A y Ent1071B) Enterocina 416K1	- - IIb -	<i>E. durans</i> L28-1 <i>E. gallinarum</i> 012 <i>E. faecalis</i> BFE 1071 <i>E. casseliflavus</i> IM 416K1	Suelo Heces (avestruz) Heces (cerdo) Embutido crudo curado	Yanagida <i>et al.</i> (2005) Jennes <i>et al.</i> (2000) Balla <i>et al.</i> (2000) Sabia <i>et al.</i> (2002)
	Enterocina A ^b Enterocina A5-11 (EntA5-11A y EntA5-11B) Enterocina AS-48 ^c Enterocina AS-48RJ Enterocina B ^d	IIa IIb IIb IIb IIb IIe	<i>E. faecium</i> CTC492 <i>E. durans</i> A5-11 <i>E. faecalis</i> S-48 <i>E. faecium</i> RJ16 <i>E. faecium</i> T136	Embutido crudo curado (fuet) Producto lácteo fermentado Agua Queso Embutido crudo curado (chorizo)	Aymerich <i>et al.</i> (1996) Batdorj <i>et al.</i> (2006) Gálvez <i>et al.</i> (1989) Abriouel <i>et al.</i> (2005) Casaus <i>et al.</i> (1997)
	Enterocina CRL35 Enterocina EJ97	IIa IIc	<i>E. mundtii</i> CRL35 <i>E. faecalis</i> EJ97	Queso Aguas residuales	Saavedra <i>et al.</i> (2004b) Gálvez <i>et al.</i> (1998)
	Enterocina GM1 Enterocina HJ35 Enterocina JS Enterocina K25 Enterocina L50 ^e (EntL50A y EntL50B) Enterocina M	- - IIc - IIb, c IIa	<i>E. faecium</i> GM1 <i>E. faecium</i> HJ35 <i>E. faecalis</i> DBH18 <i>Enterococcus</i> spp. <i>E. faecium</i> L50 <i>E. faecium</i> AL41	Heces (neonato) Piel (humana) Heces (ánade) “Kimchi” Embutido crudo curado (chorizo) Aguas residuales	Kang y Lee (2005) Yoon <i>et al.</i> (2005) Sánchez <i>et al.</i> (2005) Moon y Yung (2005) Cintas <i>et al.</i> (1998a) Mareková <i>et al.</i> (2007)
	Enterocina MR10 [†] (EntMR10A y EntMR10B)	IIb	<i>E. faecium</i> MR10-3	Glándula uropigial (abubilla)	Martín-Platero <i>et al.</i> (2006)
	Enterocina MR99 Enterocina ON-157 Enterocina P ^f	- - IIa	<i>E. faecalis</i> MR99 <i>E. faecium</i> NIAI 157 <i>E. faecium</i> P13	Ensilado Ensilado Embutido crudo curado (chorizo)	Sparo <i>et al.</i> (2006) Ohmomo <i>et al.</i> (2000) Cintas <i>et al.</i> (1997)
	Enterocina PA1 Enterocina Q	- IIc	<i>E. avium</i> PA1 <i>E. faecium</i> L50	“Pan de abeja” Embutido crudo curado (chorizo)	Audisio <i>et al.</i> (2005) Cintas <i>et al.</i> (2000d)
	Enterocina RC714 Enterocina RJ-11 [†] Enterocina SE-K4 Enterocina SF68	IIa IIc IIa -	<i>E. avium</i> RC714 <i>E. faecalis</i> RJ11 <i>E. faecalis</i> K4 <i>E. faecalis</i> SF68	Aislado clínico Salvado de arroz Ensilado Probiótico	del Campo <i>et al.</i> (2001) Yamamoto <i>et al.</i> (2003) Eguchi <i>et al.</i> (2001) Foulquié-Moreno <i>et al.</i> (2003b)
	Enterocina ST4V Enterocina ST15	- -	<i>E. mundtii</i> ST4V <i>E. mundtii</i> ST15	Semillas de soja Semillas de soja	Todorov <i>et al.</i> (2005) de Kwaadsteniet <i>et al.</i> (2005)
	Enterocina ST311LD Enterocina T Enterocina UQ31 Enterococcina A 2000 Enterococcina EFS2	- IIa - - -	<i>E. faecium</i> ST311LD <i>E. avium</i> <i>E. faecium</i> UQ31 <i>E. faecium</i> A 2000 <i>E. faecalis</i> EFS2	Aceitunas Heces (neonato) Queso Queso Queso	Todorov y Dicks (2005) Nes <i>et al.</i> (2005) Alvarado <i>et al.</i> (2005) Pantev <i>et al.</i> (2002) Maisnier-Patin <i>et al.</i> (1996)
	Enterococcina V583 Hiracina JM79	- IIa	<i>E. faecalis</i> <i>E. hirae</i> DCH5	- Animal de caza (ánade)	Swe <i>et al.</i> (2007) Sánchez <i>et al.</i> (2007a)
	Munditicina KS ^g	IIa	<i>E. mundtii</i> NFRI 7393	Ensilado	Kawamoto <i>et al.</i> (2002)

Tabla II.11. (continuación)

Clase	Bacteriocina	Subclase	Especie y cepa productora	Fuente	Referencia original
Clase III	Bacteriocina 41	-	<i>E. faecalis</i> Y1714	Aislado clínico	Tomita e Ike (2005)
	Enterocina 388C	-	<i>E. casseliflavus</i>	Embutido crudo curado	Sabia <i>et al.</i> (2004)
	Enterocina Bc-48	-	<i>E. faecalis</i> S-48	Agua	López-Lara <i>et al.</i> (1991)
	Enterolisina A	-	<i>E. faecalis</i> DPC5280 <i>E. faecalis</i> LMG2333	Leche cruda	Hickey <i>et al.</i> (2003) Nilsen <i>et al.</i> (2003)
Bacteriocinas no purificadas a homogeneidad					
	Enterocina 100-101-102	-	<i>E. faecium</i> 100	Suelo	Kato <i>et al.</i> (1993, 1994)
	Enterocina 226NWC	-	<i>E. faecalis</i> 226	Cultivo iniciador	Villani <i>et al.</i> (1993)
	Enterocina 01	-	<i>E. faecium</i> NA01	Leche fermentada	Olasupo <i>et al.</i> (1994)
	Enterocina 3587	-	<i>E. faecium</i> 3587	Queso	Dimov (2007)
	Enterocina E-760	-	<i>E. durans/faecium</i> / <i>hirae</i> NRRL B-30745	Heces (pollo)	Line <i>et al.</i> (2008)
	Enterocina EF2019	-	<i>E. faecium</i> EF2019	Heces (conejo)	Simonová y Lauková (2007)
	Enterocina EL1	-	<i>E. faecium</i> NA01	-	Lyon <i>et al.</i> (1995)
	Hiracina S	-	<i>E. hirae</i>	-	Siragusa (1992)

Entre las bacteriocinas caracterizadas con idéntica secuencia aminoacídica a las que se señalan con una letra en superíndice se incluyen:

^aenterocina de *E. faecium* B2 (Moreno *et al.*, 2002).

^benterocina 1146 de *E. faecium* DPC1146 (O'Keeffe *et al.*, 1999), enterocina 81 de *E. faecium* WHE 81 (Ennahar *et al.*, 2001), enterocina 900 de *E. faecium* BFE 900 (Franz *et al.*, 1996), enterocina BC25 de *E. faecium* BC25 (Morovsky *et al.*, 2001), enterocina CCM 4231 de *E. faecium* CCM 4231 (Lauková y Czikková, 1998), enterocina CTC492 de *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 2000b), enterocina EFM01 de *E. faecium* EFM01 (Ennahar y Deschamps, 2000), enterocinas de *E. faecium* P21 y L3 (Herranz *et al.*, 2001c; Yermolenko *et al.*, 2006) y bacteriocina 15 de *E. faecium* N15 (Losteinkit *et al.*, 2001).

^centerocina EFS2 de *E. faecalis* EFS2 (Maisnier-Patin *et al.*, 1996), enterocina 4 de *E. faecalis* INIA 4 (Joosten *et al.*, 1996), enterocina 7C5 de *E. faecium* 7C5 (Torri Tarelli *et al.*, 1994; Folli *et al.*, 2003) y bacteriocina 21 de *E. faecalis* OG1X (Tomita *et al.*, 1997).

^denterocina 900 de *E. faecium* BFE 900 (Franz *et al.*, 1996), enterocina CTC492 de *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 2000b), enterocina 81 de *E. faecium* WHE 81 (Ennahar *et al.*, 2001), enterocina RZS C5 de *E. faecium* RZS C5 (Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b) y enterocina RZS C13 de *E. faecium* RZS C13 (Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b) y enterocinas de *E. faecium* P21 y L3 (Herranz *et al.*, 2001c; Yermolenko *et al.*, 2006).

^eenterocina 1 de *E. faecium* 6T1a (Floriano *et al.*, 1998), enterocina de *E. faecium* B2 (Moreno *et al.*, 2002) y enterocina F58 de *E. faecium* F58 (Achemchem *et al.*, 2005).

^fenterocinas de *E. faecium* B1 y B2 (Moreno *et al.*, 2002) y enterocinas de *E. faecium* AA13 y G16 (Herranz *et al.*, 1999).

^gmunditocina AT06 de *E. mundtii* AT06 (Bennik *et al.*, 1998; Saavedra *et al.*, 2004b), munditocina QU2 de *E. mundtii* QU2 (Zendo *et al.*, 2005) y péptido maduro de la enterocina CRL35 (Saavedra *et al.*, 2004b).

^hNo determinado/disponible. ⁱLos autores no han estudiado la presencia de extensión N-terminal en estas bacteriocinas.

enterocina CCM4231 (Lauková *et al.*, 1993; Lauková y Czikková, 1998), enterocina GM-1 (EntGM-1) (Kang y Lee, 2005), enterocina HJ35 (Yoon *et al.*, 2005), enterocina MR99 (EntMR99) (Sparo *et al.*, 2006), EntMR10 (EntMR10A y EntMR10B) (Martín-Platero *et al.*, 2006), EntST4V (Todorov *et al.*, 2005), enterocina ST15 (de Kwaadsteniet *et al.*, 2005) y enterocina ST311LD (Todorov y Dicks, 2005), todas ellas sin purificar, inhiben a bacterias Gram-negativas. Por otra parte, se ha descrito que EntCRL35 (Wachsmann *et al.*, 2003) y EntST4V producida por *E. mundtii* ST4V (Todorov *et al.*, 2005) tienen actividad antiviral.

La variedad de las bacteriocinas producidas por los enterococos es más amplia que la descrita para otros géneros de bacterias lácticas, habiéndose caracterizado (bioquímica y/o genéticamente) más de 50 bacteriocinas diferentes (Tabla II.11) (Franz *et al.*, 1999a, 2007; Nes *et al.*, 2007). La mayoría de las enterocinas son péptidos antimicrobianos pequeños, termoestables y sin aminoácidos modificados postraduccionalmente, que pertenecen a la clase II (no lantibióticos) (sección II.3.4.1), y dentro de ésta a la: (i) subclase IIa (del tipo pediocina), como EntA (Aymerich *et al.*, 1996), EntP (Cintas *et al.*, 1997), enterocina SE-K4 (EntSE-K4) (Eguchi *et al.*, 2001) y EntCRL35 (Saavedra *et al.*, 2004b); (ii) subclase IIb (sistemas de dos péptidos), como EntL50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a),

enterocina 1071 (Ent1071 [Ent1071A y Ent1071B]) (Balla *et al.*, 2000), y EntMR10 (EntMR10A y EntMR10B) (Martín-Platero *et al.*, 2006); (iii) subclase IIc, como EntL50 (EntL50A y EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a), EntQ (Cintas *et al.*, 2000d), EntEJ97 (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003) y, probablemente, enterocina RJ-11 (EntRJ-11) (Yamamoto *et al.*, 2003), enterocina JS (EntJS) (Sánchez *et al.*, 2005) y EntMR10 (EntMR10A y EntMR10B) (Martín-Platero *et al.*, 2006); (iv) subclase IId, como EntAS-48 (Gálvez *et al.*, 1989) y enterocina AS-48RJ (Abriouel *et al.*, 2005) y (v) subclase IIe, como EntB (Casaus *et al.*, 1997). No obstante, se han descrito enterocinas con aminoácidos modificados postraduccionalmente (clase I, lantibióticos), como Cyl (Gilmore *et al.*, 1994; Booth *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 2005) y la columbicina A (Martín *et al.*, 2003), así como enterocinas con tamaño molecular de hasta 34 kDa, pertenecientes a la clase III, como EnlA (Nilsen *et al.*, 2003) (Tabla II.11).

Los genes que codifican las enterocinas pueden estar localizados en: (i) un plásmido, como en el caso de la bacteriocina 32 (Inoue *et al.*, 2006), bacteriocina 41 (Tomita e Ike, 2005), bacteriocina Bc-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1992), bacteriocina T8 (de Kawaaddsteniet *et al.*, 2006), Cyl (Gilmore *et al.*, 1994), EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006a), EntQ (Criado *et al.*, 2006a), enterocina 226NWC (Salzano *et al.*, 1992), enterocina 388C (Sabia *et al.*, 2004), Ent416K1 (Sabia *et al.*, 2002), Ent1071 (Ent1071A y Ent1071B) (Balla *et al.*, 2000), EntAS-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1990), EntCRL35 (Saavedra *et al.*, 2004b), EntEJ97 (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003), EntMR99 (Sparo *et al.*, 2006), enterocina ON-157 (Ohmomo *et al.*, 2000) y EntSE-K4 (Doi *et al.*, 2002) o (ii) el cromosoma, como en el caso de EntA (Ennahar *et al.*, 2001), EntB (Ennahar *et al.*, 2001), EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* B2 (Moreno *et al.*, 2002), EntMR10 (EntMR10A y EntMR10B) (Martín-Platero *et al.*, 2006) y EntP (Herranz, 2001; Moreno *et al.*, 2002; Criado *et al.*, 2006a). No obstante, la localización de los genes que codifican una bacteriocina puede variar según la cepa productora (sección II.3.4.7), como se ha descrito en los casos de: (i) EntL50 (EntL50A y EntL50B), cuya agrupación génica se localiza en el plásmido pCIZ1 (aprox., 50 kb) de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998a; Criado *et al.*, 2006a), pEF1 (aprox., 23 kb) de *E. faecium* 6T1 (Floriano *et al.*, 1998), en el plásmido de 22 kb de *E. faecium* F58 (Achemchem *et al.*, 2005) y en el cromosoma de *E. faecium* B2 y *E. faecium* BFE1072 (du Toit *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002) y (ii) EntAS-48, cuya agrupación génica se localiza en el plásmido pMB2 de *E. faecium* S-48 (Martínez-Bueno *et al.*, 1990) y en el cromosoma de *E. faecium* RJ16 (Abriouel *et al.*, 2005). Asimismo, recientemente se ha descrito que los determinantes genéticos que codifican EntP se localizan en el plásmido pCIZ1 y cromosoma de *E. faecium* L50 (sección II.4.4.1.2) (Criado, 2006).

Desde el punto de vista tecnológico e higiénico-sanitario, las enterocinas son sustancias antimicrobianas interesantes para la industria alimentaria ya que tienen un gran potencial de aplicación en tratamientos combinados para la conservación de alimentos fermentados, refrigerados y/o pasteurizados, debido a su potente actividad frente a microorganismos patógenos y/o alterantes presentes en los alimentos (especialmente frente a *Listeria* spp.) y a algunas de sus propiedades que les confieren ventajas, frente a otras bacteriocinas, como bioconservantes alimentarios. Entre estas propiedades se incluyen las siguientes: (i) estabilidad en condiciones extremas, como las que tienen lugar durante la fermentación de los productos cárnicos y lácteos, (ii) actividad antimicrobiana a bajas

temperaturas durante largos periodos de tiempo, (iii) producción y estabilidad en leche en el rango de temperaturas 30–37°C, (iv) resistencia a la renina, (v) compatibilidad con las bacterias lácticas empleadas como cultivos iniciadores, (vi) actividad anti-*Listeria* en leche, (vii) estabilidad al calor y (viii) estabilidad en un amplio rango de valores de pH, si bien son más activas a valores ácidos (Giraffa, 1995; Cintas *et al.*, 2000b; Giraffa, 2003; Martínez *et al.*, 2003). Debido a este interés tecnológico, se han desarrollado numerosos estudios que demuestran la eficacia del empleo de algunas enterocinas como aditivos alimentarios (Tabla II.12).

Tabla II.12. Aplicaciones potenciales de las enterocinas como aditivos alimentarios

Enterocina	Aplicación	Referencia
Enterocina 226 NWC	Queso “Mozzarella”	Villani <i>et al.</i> (1993)
Enterocina 4	Sistema lácteo modelo	Rodríguez <i>et al.</i> (1997)
Enterocina AS-48	Sistema cárnico modelo	Ananou <i>et al.</i> (2005)
	Zumo	Grande <i>et al.</i> (2005)
	Sistema vegetal modelo	Grande <i>et al.</i> (2006a)
	Sidra y zumo de manzana	Grande <i>et al.</i> (2006a)
	Conservas vegetales	Lucas <i>et al.</i> (2006)
Enterocina CCM4231	“Leche” de soja	Lauková y Czikková (1999)
	Productos lácteos	Lauková <i>et al.</i> (1999a)
	Salami “Hornád”	Lauková <i>et al.</i> (1999b)
	“Brynzda” (producto lácteo eslovaco)	Lauková y Czikková (2001)
Enterocina CRL35	Queso de cabra	Fariás <i>et al.</i> (1999)
	Sistema cárnico modelo	Vignolo <i>et al.</i> (2000)
Enterocina CTC492	Productos cárnicos	Aymerich <i>et al.</i> (2000b)
	Carne de cerdo tratada térmicamente	Aymerich <i>et al.</i> (2002)

Adaptado de Foulquié-Moreno et al. (2006) y Criado (2006).

II.4.4.1. ENTEROCINAS PRODUCIDAS POR *Enterococcus faecium* L50

E. faecium L50 es una cepa aislada de un embutido crudo curado español (chorizo) elaborado artesanalmente sin la adición de cultivos iniciadores (Cintas, 1995; Cintas *et al.* 1995). Esta cepa presenta dos plásmidos (pCIZ1 [aprox., 50 kb] y pCIZ2 [aprox., 7,4 kb]) y su actividad antimicrobiana se debe a la producción, bajo regulación térmica (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 2000d; Criado *et al.*, 2006b), de tres bacteriocinas (cuatro péptidos) (Tabla II.13) de amplio espectro de acción: (i) enterocina L50 (EntL50 [L50A y L50B], sistema de dos péptidos [EntL50A y EntL50B]) (Cintas *et al.*, 1995, 1998a); (ii) EntP (Cintas *et al.*, 2000d) y (iii) EntQ (Cintas *et al.*, 2000d). *E. faecium* L50 posee actividad antimicrobiana frente a: (i) microorganismos alterantes de los alimentos (por ej.: *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* y *Propionibacterium* spp.); (ii) microorganismos patógenos productores de toxiinfecciones alimentarias (por ej.: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Cl. botulinum* y *Cl. perfringens*) y de otras patologías humanas y animales (por ej.: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* y *St. agalactiae*) y (iii) bacterias lácticas (Tabla II.14) (Cintas *et al.*, 1998b, 2000d).

Tabla II.13. Características principales de las enterocinas producidas por *E. faecium* L50

Enterocina		Nº aa	M _M (Da)	pI	Extensión N-terminal ^a	Referencia
Enterocina L50	EntL50A	43	5.190	10,22	–	Cintas <i>et al.</i> (1998a)
	EntL50B	44	5.178	10,07	–	Cintas <i>et al.</i> (1998a)
Enterocina P		44	4.630	9,81	+ (péptido señal)	Cintas <i>et al.</i> (2000d)
Enterocina Q		34	3.952	9,39	–	Cintas <i>et al.</i> (2000d)

^aLos símbolos + y – representan presencia y ausencia, respectivamente.

Tabla II.14. Especies bacterianas incluidas en el espectro de acción antimicrobiana de *E. faecium* L50

Género	Especie
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Cl. botulinum</i>
	<i>Cl. perfringens</i>
	<i>Cl. sporogenes</i>
	<i>Cl. tyrobutyricum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>
	<i>E. faecium</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
	<i>Lb. bulgaricus</i>
	<i>Lb. casei</i>
	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. helveticus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. cremoris</i>
	<i>Lc. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Le. cremoris</i>
<i>Listeria</i>	<i>L. innocua</i>
	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
	<i>P. pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>Pr. acidilactici</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>S. carnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>St. pneumoniae</i>
	<i>St. mitis</i>
	<i>St. oralis</i>
	<i>St. parasanguis</i>
	<i>St. agalactiae</i>

Adaptado de Cintas (1995) y Cintas et al. (1995, 1998b).

II.4.4.1.1. Enterocina L50 (L50A y L50B)

La enterocina L50 (EntL50 [EntL50A y EntL50B]) es una bacteriocina descrita por primera vez en *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995), que está ampliamente distribuida en la naturaleza, habiéndose observado su producción y/o la presencia de sus genes estructurales en cepas de *E. faecium* aisladas de embutidos crudos curados, carne y animales de granja y caza, leche, quesos, pescados, mariscos, productos de la pesca, aceitunas fermentadas, “*Tempeh*”, “*Jben*”, heces y muestras clínicas (Cintas *et al.*, 1998a; Floriano *et al.*, 1998; du Toit *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002; de Vuyst *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b; Gómez *et al.*, 2004a, b; Achemchem *et al.*, 2005; Citti, 2005; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006, 2007b; Poeta *et al.*, 2007; Theppangna *et al.*, 2007; Klibi *et al.*, 2008). Enterocina L50 (L50A y L50B) es un sistema de dos péptidos (EntL50A y EntL50B) (subclase IIb), cuyos componentes presentan una elevada homología (72% de identidad) (Fig. 2.6.A), tienen un pequeño tamaño molecular (44 y 43 aa, respectivamente) y son termoestables, catiónicos e hidrófobos (Cintas *et al.*, 1998a). No obstante, la comparación de las secuencias aminoacídicas de EntL50A y EntL50B, determinadas mediante degradación de Edman, con las deducidas de la secuencia nucleotídica de sus genes estructurales demostró que los péptidos EntL50A y EntL50B se sintetizan sin ninguna extensión N-terminal (Cintas *et al.*, 1998a), por lo que también pueden incluirse en la subclase IIc. Recientemente, Criado *et al.* (2006b) han demostrado que los determinantes genéticos que

codifican la producción e inmunidad de EntL50A y EntL50B en *E. faecium* L50 se localizan en el plásmido pCIZ1 (aprox., 50 kb), y que la producción de estas enterocinas está influida por la temperatura de incubación. Así pues, EntL50A y EntL50B se producen en el rango de temperaturas de 16–42°C, y su producción es máxima a 25°C. A este respecto, cuando la temperatura es superior a 37°C la producción disminuye significativamente y, a partir de 42°C, estas enterocinas no muestran actividad antimicrobiana detectable (Criado *et al.*, 2006b). Por otra parte, se ha descrito una bacteriocina producida por *E. faecalis* MR10-3 aislado de la glándula uropigial de la abubilla (Martín-Platero *et al.*, 2006), denominada EntMR10 (EntMR10A y EntMR10B), cuyos dos péptidos (EntMR10A y EntMR10B) presentan una elevada homología (98 y 96% de identidad, respectivamente) con EntL50A y EntL50B (Fig. 2.6.B), y, por lo tanto, podría considerarse una variante de EntL50. Asimismo, Batdorj *et al.* (2006) aislaron, de un producto lácteo fermentado típico de Mongolia (“*Airag*”), la cepa *E. durans* A5-11 productora de otra bacteriocina que presenta un sistema de dos péptidos (A5-11A y A5-11B), y cuyas masas moleculares, composiciones aminoacídicas y espectros de actividades son muy similares a EntL50A y EntL50B, no obstante, aún no se ha realizado la secuenciación aminoacídica de estos dos péptidos. Por otra parte, las secuencias de EntRJ-11 y EntJS producidas por *E. faecalis* RJ-11 y *E. faecalis* DBH18, respectivamente, presentan una elevada homología con la de EntL50A (75% de identidad) (Fig. 2.6.C) y con la de EntL50B (95% de identidad) (Fig. 2.6.D), respectivamente (Yamamoto *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2005).

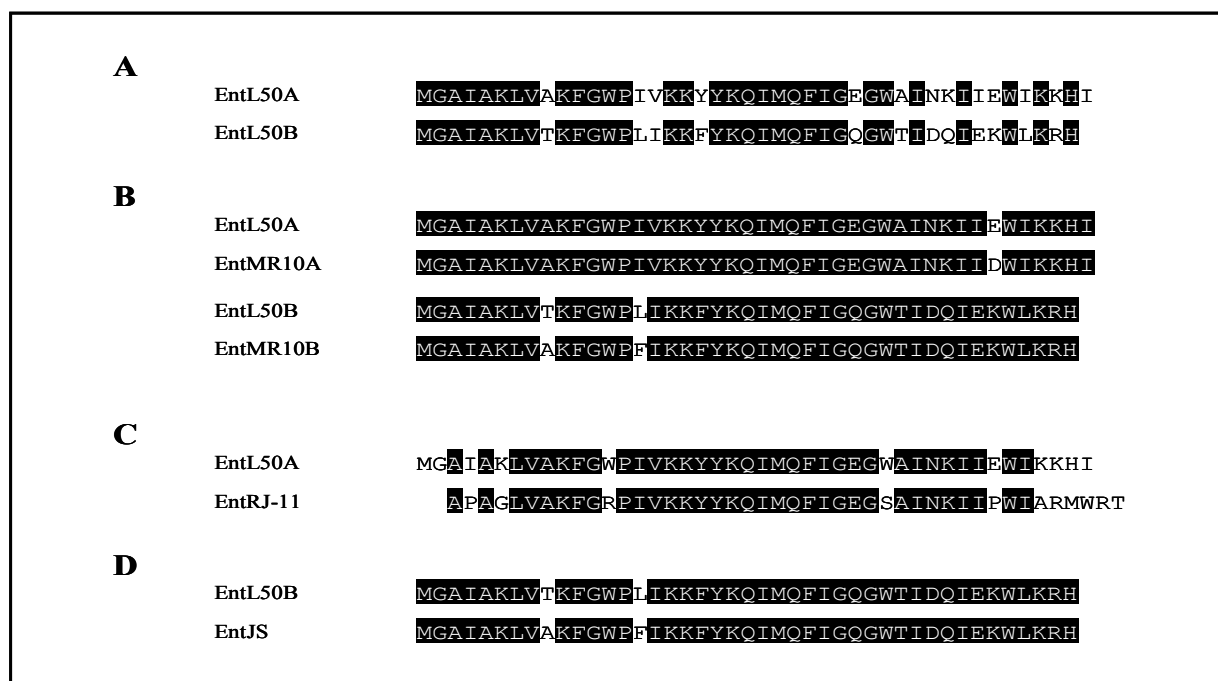


Figura 2.6. (A) Alineamiento de las secuencias de los dos péptidos del sistema de EntL50 (EntL50A y EntL50B). (B) Alineamiento de las secuencias de los dos péptidos de los sistemas de EntL50 (EntL50A y EntL50B) y EntMR10 (EntMR10A y EntMR10B). (C) Alineamiento de las secuencias de EntL50A y EntRJ-11. (D) Alineamiento de las secuencias de EntL50B y EntJS. Los residuos conservados se muestran sobre fondo negro. Adaptado de Cintas *et al.* (1998a) (A), Martín-Platero *et al.* (2006) (B), Yamamoto *et al.* (2003) (C) y Sánchez *et al.* (2005) (D).

EntL50 (EntL50A y EntL50B) muestra, a diferencia de otras enterocinas, un espectro de acción antimicrobiana muy amplio y ejerce una potente actividad antimicrobiana frente a: (i) otras bacterias lácticas (*Lb. acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. sakei*, *Lc. cremoris*, *Lc. lactis*, *Leuconostoc cremoris*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *P. acidilactici* y *Pediococcus pentosaceus*); (ii) bacterias alterantes de los alimentos (*Cl. sporogenes* y *Propionibacterium* spp.); (iii) bacterias patógenas productoras de toxiinfecciones alimentarias (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Cl. botulinum* y *Clostridium perfringens*) y (iii) bacterias patógenas de humanos y animales como *St. pneumoniae*, *St. mitis*, *St. oralis*, *St. parasanguis* y *St. agalactiae* (Cintas *et al.*, 1998b, 2000d).

Estudios de transcripción/traducción *in vitro* han demostrado que los dos péptidos (EntL50A y EntL50B), a diferencia de los componentes de otras bacteriocinas de la subclase IIb, presentan actividad antimicrobiana individualmente, siendo EntL50A más activo que EntL50B frente a *P. acidilactici* 347, *E. faecium* T136, *Lc. lactis* CNRZ177 y *Lb. sakei* 148, y que, además, la actividad antimicrobiana de ambos péptidos es sinérgica, si bien el grado de sinergismo varía considerablemente (de 4 a 12 veces) dependiendo de la especie indicadora empleada (Cintas *et al.*, 1998a).

El análisis genético de una región de 21.446 pb del plásmido pCIZ1 (50 kb aprox.) (Fig. 2.7) de *E. faecium* L50 reveló la presencia de 27 hipotéticos genes (*orf*, del inglés *Open Reading Frame*) organizados en cuatro regiones diferenciadas, delimitadas por tres elementos de inserción (IS1216L, IS1216R y IS1514): (i) región I (*orf1–3*), implicada en la producción de EntP; (ii) región II (*orf5–11*), que incluye genes relacionados con la síntesis de desoxirribonucleótidos; (iii) región III (*orf 13–15*), que incluye genes relacionados con la supervivencia bajo condiciones de estrés medioambiental (agentes oxidantes y metales) y (iv) región IV (*orf 18–27*), implicada en la síntesis y, probablemente, secreción e inmunidad a EntL50 (EntL50A y EntL50B) (Criado, 2006). En esta región, los primeros seis genes de la agrupación génica de EntL50 están implicados en la síntesis de EntL50A y EntL50B (*entL50A* y *entL50B*) y, probablemente, en su secreción y en la inmunidad frente a esta bacteriocina (*entL50CDEF*). Sin embargo, el análisis de estos productos génicos (EntL50C, EntL50D, EntL50E y EntL50F) no permitió identificar rasgos típicos de transportadores del tipo ABC (sección II.5.1.1), por lo que el transportador del tipo ABC EntL50GHIIJ podría tener una función dual, estando implicado en la secreción y la inmunidad a esta bacteriocina, de forma similar al transportador MDR del tipo ABC LmrB de *Lc. lactis* BGM-1 (Gajic *et al.*, 2003), responsable del transporte e inmunidad a las bacteriocinas LsbA y LsbB (carente de extensión N-terminal) (Gajic *et al.*, 2003). Además, el análisis de hibridación ARN-ADN del tipo *Northern-blot* empleando una sonda específica de *entL50A* y *entL50B* marcada radiactivamente, demostró que estos genes se cotranscriben en un único ARNm policistrónico (aprox., 0,4 kb) y que, por lo tanto, constituyen un único operón (Cintas *et al.*, resultados no publicados).

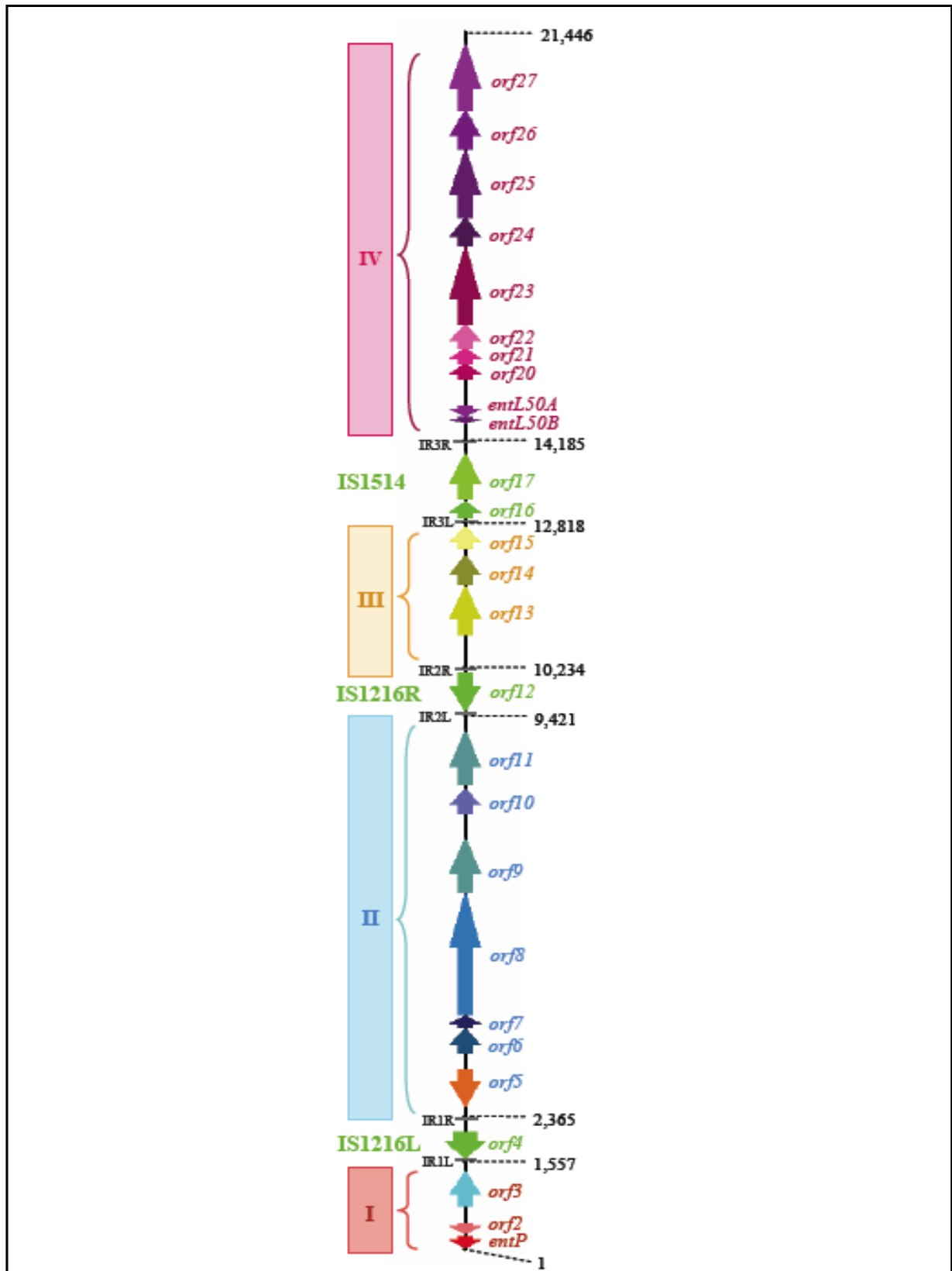


Figura 2.7. Representación esquemática de la organización genética de una región de 21.446 pb del plásmido pCIZ1 de *E. faecium* L50. Los ORFs se representan mediante flechas indicando la dirección de la transcripción. IR, secuencia repetida inversa (del inglés *Inverted Repeat*); IS, secuencia de inserción (del inglés *Insertion Sequence*). Fuente: Criado (2006).

II.4.4.1.2. Enterocina P

La enterocina P (EntP) es una bacteriocina de la subclase IIa descrita por primera vez en *E. faecium* P13, una cepa aislada de un embutido crudo curado español (chorizo) elaborado artesanalmente sin la adición de cultivos iniciadores (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998), que, al igual que EntL50, está ampliamente distribuida en la naturaleza, habiéndose descrito su producción y/o la presencia de su gen estructural en cepas de *E. faecium*, *E. durans* y *Enterococcus haemoperoxidus* aisladas de carne y animales de granja y caza, embutidos crudos curados, leche, quesos, pescados, mariscos, productos de la pesca, “*Tempeh*”, ensilados, heces, purines y muestras clínicas (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998; Herranz *et al.*, 1999; du Toit *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2002; de Vuyst *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2003b; Mareková *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2004a, b; Achemchem *et al.*, 2005; Citti, 2005; Abriouel *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006, 2007b; Lauková *et al.*, 2007; Poeta *et al.*, 2007; Simonová y Lauková, 2007; Klibi *et al.*, 2008). EntP es un péptido de pequeño tamaño molecular (44 aa), termoestable, catiónico e hidrófobo que presenta, en su extremo N-terminal, la secuencia consenso YGNGVXCX₄CXV (donde X representa un residuo aminoácido no conservado), característica de las bacteriocinas del tipo pediocina (sección II.3.4.1), con dos residuos Cys (Cys₉ y Cys₁₁). Recientemente, Criado *et al.* (2006b) han demostrado que los determinantes genéticos que codifican la producción e inmunidad de EntP en *E. faecium* L50 se localizan en el cromosoma y el plásmido pCIZ1 (aprox., 50 kb), y que su producción está influida por la temperatura de incubación, así pues, EntP se produce en el rango de temperaturas de 16–47°C, y su producción es máxima a 37°C. Por otra parte, se ha descrito que las secuencias parciales de EntGM-1 y la enterocina M producidas por *E. faecium* GM-1 y *E. faecium* AL41, respectivamente, presentan una elevada homología (82,9 y 94,9% de identidad, respectivamente) con la de EntP (Kang y Lee, 2005; Mareková *et al.*, 2007). Asimismo, la secuencia de SakA y CbnBM1 producidas por *Lb. sakei* Lb706 y *C. piscicola* LV17B, respectivamente, presentan también una elevada homología (80,5 y 74,4% de identidad, respectivamente) con la de EntP (Quadri *et al.*, 1994; Axelsson y Holck, 1995). Por otra parte, EntP muestra un amplio espectro de acción y ejerce una potente actividad antimicrobiana frente a: (i) otras bacterias lácticas (*Lb. curvatus*, *Lb. fermentum*, *Lb. sakei*, *Lc. lactis*, *E. faecalis*, *E. faecium* y *P. pentosaceus*); (ii) bacterias alterantes de los alimentos (*Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* y *Propionibacterium* spp.) y (iii) bacterias patógenas productoras de toxiinfecciones alimentarias (*B. cereus*, *Cl. botulinum*, *Cl. perfringens*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*) (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998).

El análisis genético de regiones de 755, 707 y 963 pb del operón de EntP de *E. faecium* P13, *E. faecium* G16 y *E. faecium* L50, respectivamente, reveló en todos los casos la presencia contigua del gen estructural (*entP*) y del hipotético gen de inmunidad (*entiP*), aparentemente organizados en un único operón (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2000d; Herranz, 2001). El gen estructural *entP* codifica un precursor de la bacteriocina, denominado preEntP (prepéptido de 71 aa), compuesto por: (i) un SP (27 aa) con características típicas de los péptidos señal de las proteínas procesadas, transportadas y secretadas mediante el sistema Sec (sección II.5.1.2) y (ii) la secuencia correspondiente a la bacteriocina madura (EntP) de 44 aminoácidos. Inmediatamente detrás se sitúa el gen de

inmunidad *entiP*, que codifica una proteína de inmunidad de 88 aminoácidos (EntiP), encargada de proteger a la cepa productora de la acción tóxica de EntP. A pesar de que la secuencia de EntiP presenta una elevada homología con las proteínas de inmunidad de otras bacteriocinas de la subclase IIa (CurA y CbnBM1) (Cintas *et al.*, 1997), EntiP únicamente protege a células sensibles frente a la acción antimicrobiana de EntP y CurA (Fimland *et al.*, 2002). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la translocasa Sec es la encargada del procesamiento de PreEntP y de la secreción de la bacteriocina madura EntP (Herranz y Driessen, 2005).

Con respecto a su modo de acción, EntP ejerce una acción bactericida no bacteriolítica frente a células sensibles de *E. faecium* T136. En este sentido, se ha demostrado que EntP origina: (i) una reducción significativa del ATP intracelular de las células sensibles, pero sin un incremento del ATP extracelular y (ii) una reducción significativa del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) debida a la inducción del movimiento transmembrana de cationes K^+ , pero sin afectar al gradiente de pH (ΔpH). Por otro lado, EntP también altera la permeabilidad de liposomas derivados de *E. faecium* T136 de manera concentración- y tiempo-dependiente, si bien es inactiva frente a liposomas sintéticos. Asimismo, se ha demostrado que EntP induce la formación de canales iónicos selectivos en células sensibles y de poros menos selectivos en liposomas derivados de éstas (Herranz *et al.*, 2001a, c).

II.4.4.1.3. Enterocina Q

La enterocina Q (EntQ) es una bacteriocina de la subclase IIc descrita por primera vez en *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 2000d), que, al igual que EntL50 y EntP, está ampliamente distribuida en la naturaleza, habiéndose descrito su producción y/o la presencia de su gen estructural en cepas de *E. faecium* aisladas de embutidos crudos curados, carne y animales de granja y caza, leche, quesos, pescados, mariscos, productos de la pesca, heces y muestras clínicas (Cintas *et al.*, 2000d; Gómez *et al.*, 2004a, b; Citti, 2005; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006, 2007b; Poeta *et al.*, 2007; Klibi *et al.*, 2008). EntQ es un péptido de pequeño tamaño molecular (34 aa), termoestable, catiónico e hidrófobo. Recientemente, Criado *et al.* (2006b) han demostrado que los determinantes genéticos que codifican la producción e inmunidad de EntQ en *E. faecium* L50 se localizan en el plásmido pCIZ2 (aprox., 7,4 kb), y que su producción está influida por la temperatura de incubación, así pues, EntQ se produce en el rango de temperaturas de 16–47°C, y su producción es máxima a 47°C, disminuyendo significativamente cuando la temperatura es inferior a 32°C (Criado *et al.*, 2006b). Por otra parte, EntQ muestra un espectro de acción reducido que incluye, entre otros microorganismos, bacterias lácticas como *Lb. sakei*, *E. faecium*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* (Cintas *et al.*, 2000d).

El análisis genético del plásmido pCIZ2 (7.383 pb) (Fig. 2.8) de *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 2000d) reveló la presencia de 10 hipotéticos ORFs organizados en tres regiones diferentes: (i) región I (*orf1–3*), implicada en la síntesis, secreción e inmunidad de EntQ; (ii) región II (*orf4–7*), que contiene genes relacionados con la movilización plasmídica y (iii) región III (*orf8–10*), implicada en la replicación plasmídica. En la región I, *orf1* (*entqA*) corresponde al gen estructural de EntQ (previamente designado *entQ*), que codifica un péptido de 34 aminoácidos (3.952 Da) carente de extensión N-terminal, al igual que EntL50A y EntL50B (Cintas *et al.*, 2000d; Criado *et al.*, 2006a). El

gen *orf2* (*entqB*) codifica una proteína de 572 aminoácidos que muestra una gran homología con otros transportadores del tipo ABC (sección II.5.1.1) y que está implicada en la secreción de EntQ (Criado *et al.*, 2006a). El análisis de EntqB reveló que presenta seis regiones hidrofóbicas, que pueden constituir seis segmentos transmembrana, y rasgos típicos del dominio de unión del ATP (ATPasa) de los transportadores del tipo ABC (sección II.5.1.1) (Fath y Kolter, 1993; Scheneider y Hunde, 1998; Young y Holland, 1999; Dassa, 2000). *orf3* (*entqC*) codifica una proteína de membrana de 64 aminoácidos encargada de proteger a la cepa productora de la acción tóxica de EntQ que no muestra homología significativa con ninguna proteína descrita y que presenta dos regiones hidrofóbicas que pueden constituir dos segmentos transmembrana (Criado *et al.*, 2006a).

Por otra parte, la mínima región necesaria para la replicación del plásmido pCIZ2 (denominada replicón mínimo) corresponde a un fragmento de, aproximadamente, 1,2 kb que contiene el origen de replicación (*ori*), constituido por dos juegos de secuencias repetidas directas de 12 y 22 pb, y el gen *orf8* (*repE*) que codifica la proteína iniciadora de la replicación RepE. Asimismo, pCIZ2 es un plásmido caracterizado por un mecanismo de replicación en “*theta*” bidireccional, una gran estabilidad sugregacional y su capacidad de replicación también en *P. acidilactici* (Criado *et al.*, 2006a).

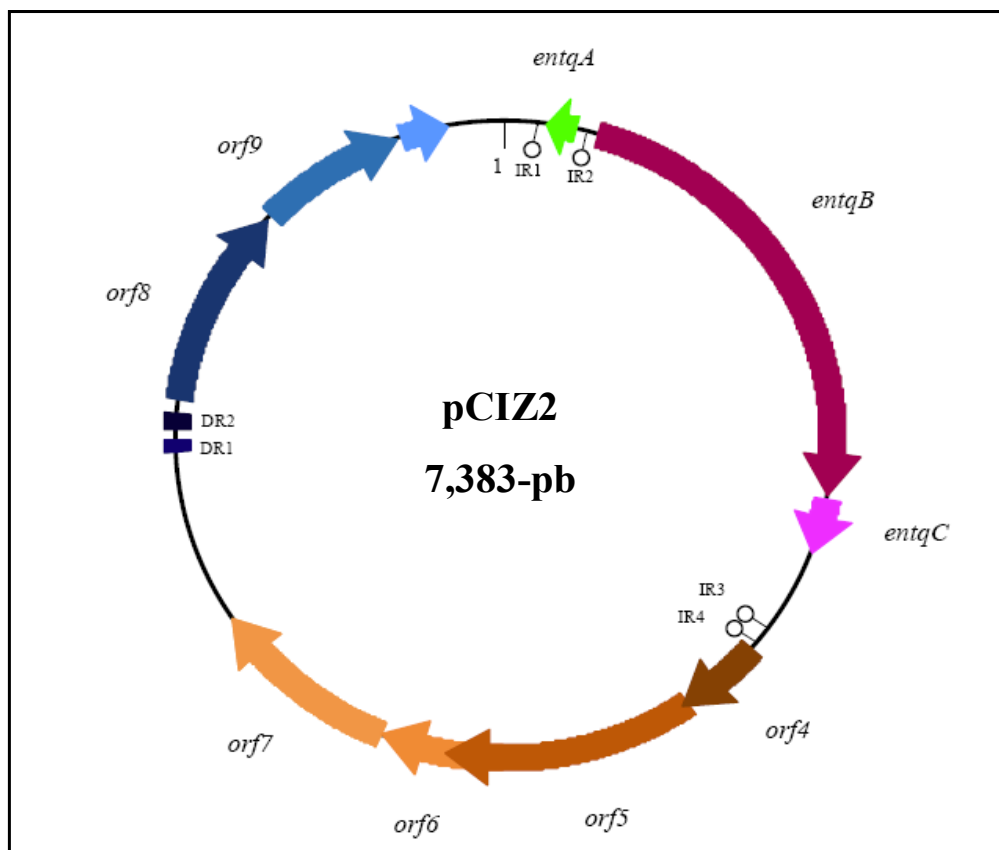


Figura 2.8. Mapa genético del plásmido pCIZ2 de *E. faecium* L50. Fuente: Criado *et al.* (2006a).

II.4.4.1.4. Utilización de las enterocinas producidas por *Enterococcus faecium* L50 como bioconservantes de los alimentos

Conviene destacar que EntL50 y EntP muestran diversas características que las convierten en bacteriocinas candidatas para su utilización como bioconservantes de los alimentos, entre las que se incluyen: (i) su amplio espectro de acción frente a bacterias patógenas y alterantes presentes potencialmente en los alimentos; (ii) su sensibilidad a enzimas proteolíticas; (iii) su elevada estabilidad a altas temperaturas durante largos periodos de tiempo (100 y 121°C durante 60 y 15 min, respectivamente) y a amplios intervalos de pH (pH 2–11) y (iv) la resistencia de su actividad antimicrobiana al almacenamiento a 4 y –20°C durante largos periodos de tiempo, a la congelación/descongelación y a la liofilización (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998; Herranz, 2001; Gutiérrez, 2005). No obstante, debido a los problemas que conlleva la utilización de los enterococos en la industria alimentaria (sección II.4.3.3.4), la aplicación de *E. faecium* L50 en la industria alimentaria requeriría la evaluación exhaustiva de su seguridad. Por todo ello, resulta de gran interés la clonación y expresión funcional de los genes necesarios para la producción y secreción de EntL50 (EntL50A y EntL50B) y/o EntP en bacterias lácticas, mohos o levaduras con *status* GRAS o QPS empleadas en la elaboración de alimentos y bebidas (por ej.: *Lc. lactis*, *St. thermophilus*, *Lactobacillus* spp., *Penicillium* spp. y *Sc. cerevisiae*), lo que permitiría obtener microorganismos recombinantes productores de estas enterocinas de gran utilidad en la moderna y futura industria alimentaria.

II.5. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN PROCARIOTAS Y LEVADURAS

En general, la mayoría de péptidos y proteínas sintetizados por procariotas y eucariotas se localizan en el interior celular, y sólo unos pocos péptidos y proteínas se liberan al medio extracelular. La liberación al medio extracelular de péptidos y proteínas supone una ventaja en la producción heteróloga de proteínas, puesto que si se consigue secretar la proteína de interés por un hospedador, su purificación se facilitaría por la ausencia de un gran número de proteínas no liberadas al medio extracelular (Henderson, 2004). Sin embargo, los mecanismos de procesamiento y secreción de proteínas son muy complejos y, generalmente, los rendimientos en la producción heteróloga de proteínas liberadas al medio extracelular no son elevados, sobre todo, cuando se utiliza como hospedador la bacteria Gram-negativa *E. coli* (Choi y Lee, 2004). A este respecto, las proteínas secretadas por *E. coli* deben atravesar dos membranas, la membrana interna y la externa, y su paso por ambas “barreras” depende de la estructura aminoacídica de la proteína. En el caso de las bacterias Gram-positivas, que poseen una única membrana, los rendimientos en la producción heteróloga de proteínas pueden ser mayores, de modo que estas bacterias constituyen una alternativa frente a las Gram-negativas para la producción de péptidos y proteínas de interés comercial (van Wely *et al.*, 2001). En este contexto, la búsqueda de nuevas y mejores alternativas de expresión heteróloga de

proteínas ha propiciado la utilización de hospedadores eucariotas, como las levaduras (Cregg *et al.*, 1993). Aunque *a priori* los sistemas de procesamiento, transporte y secreción de proteínas en levaduras parecen ser más complejos que los utilizados por las bacterias, la disponibilidad de vectores de expresión que permiten la producción de proteínas heterólogas en el sobrenadante de levaduras (por ej.: *Sc. cerevisiae* y *Pichia pastoris*) constituye una de las causas de elección de estos microorganismos eucariotas como hospedadores heterólogos (Cereghino y Cregg, 1999). A continuación, se describen algunos mecanismos de procesamiento, transporte y secreción de proteínas en procariotas y levaduras.

II.5.1. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN PROCARIOTAS

Muchas de las proteínas sintetizadas en el citoplasma bacteriano deben atravesar una o dos “barreras” hasta alcanzar su lugar de acción. Dado que las células necesitan una “señal” para distinguir las proteínas citoplasmáticas de las secretadas al exterior, muchas de las proteínas secretadas se sintetizan como precursores inactivos con un SP (van Wely *et al.*, 2001) que actúa como lugar de reconocimiento para su procesamiento, transporte y secreción por el sistema Sec. Sin embargo, algunas proteínas y otros compuestos de diversa naturaleza pueden secretarse por sistemas de transporte y secreción específicos como el sistema de transporte del tipo ABC o sistema de secreción tipo I o sistema de transporte dedicado (DTS, del inglés *Dedicated Transport System*), por el sistema de secreción dependiente de contacto o tipo III (Plano *et al.*, 2001), por el sistema tipo IV (Christie, 2001) o por el sistema de autotransporte o tipo V (Desvaux *et al.*, 2004).

A continuación, se describen las características más relevantes del sistema de transporte del tipo ABC y del sistema Sec.

II.5.1.1. SISTEMA DE TRANSPORTE DEL TIPO ABC O SISTEMA DE TRANSPORTE DEDICADO

Los transportadores del tipo ABC o Sec-independientes son activos en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en las que no sólo dirigen la secreción e internalización de muchas sustancias (por ej.: antibióticos, proteínas y bacteriocinas), sino que también intervienen en numerosos procesos celulares y en su regulación (Fath y Kolter, 1993; Dassa y Bouige, 2001). Estos transportadores constituyen una de las más abundantes familias de proteínas citoplásmicas y, de hecho, se ha demostrado que casi el 5% del genoma de *E. coli* está constituido por genes que codifican componentes de este sistema transportador (Higgins, 2001). Los transportadores del tipo ABC son específicos para una proteína o grupo de proteínas de la misma familia (Wandersman, 1992) y están compuestos por un miembro de la familia de los transportadores del tipo ABC, una proteína accesoria de membrana y, en las bacterias Gram-negativas, una proteína de la membrana externa (Fig. 2.9). Los genes que codifican el transportador del tipo ABC y la proteína accesoria suelen ser contiguos, mientras que el que codifica la proteína de la membrana externa puede localizarse a continuación de los dos anteriores o independientemente de los mismos (Håvarstein *et al.*, 1995; Franke, 1998).

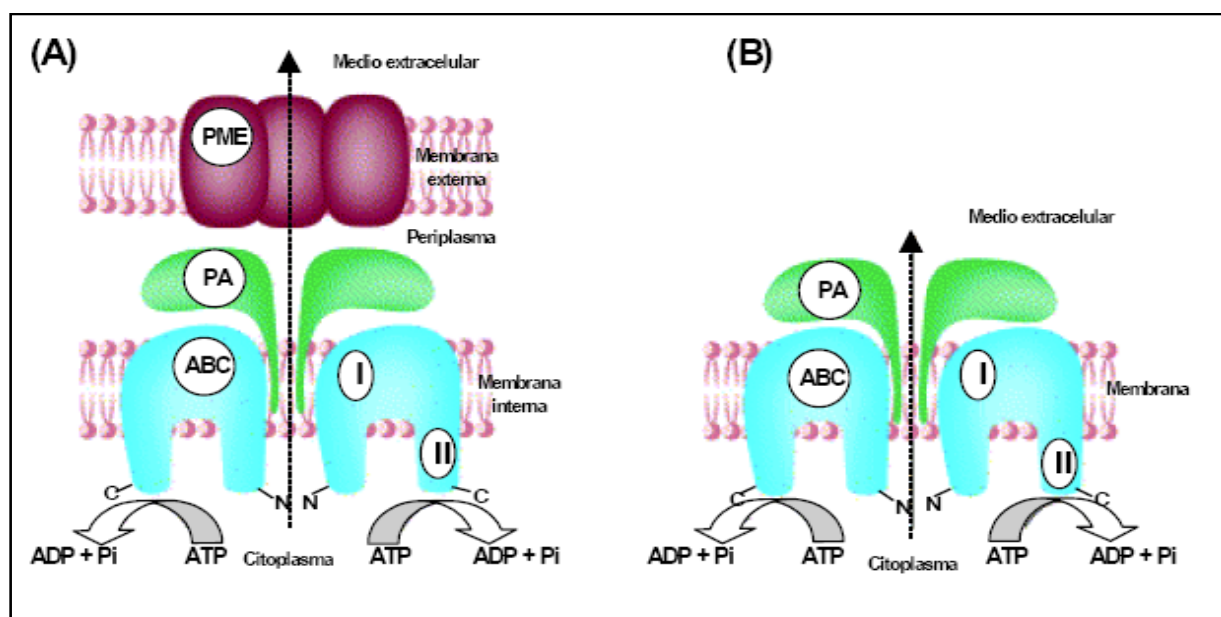


Figura 2.9. Representación esquemática de un sistema de secreción clásico en bacterias Gram-negativas (A) y Gram-positivas (B). La proteína transportadora (ABC) posee un dominio hidrófobo N-terminal (I) y otro hidrófilo C-terminal (II) que contiene los sitios de unión para el ATP. La proteína accesoria (PA) interacciona con el transportador del tipo ABC y, en las bacterias Gram-negativas, con una proteína de la membrana externa (PME), formando un canal de translocación. *Adaptado de Michiels et al. (2001) y Martín (2006).*

Un transportador del tipo ABC clásico consta de cuatro dominios, dos dominios TMD situados en la región N-terminal, y dos dominios de unión al ATP localizados a nivel C-terminal (Higgins, 2001). Los dominios TMD son hidrófobos y, generalmente, contienen seis segmentos transmembrana (TMS, del inglés *Transmembrane Segment*) mientras que los dominios de unión al ATP son hidrófilos y se encuentran situados en el lado citoplasmático de la membrana (Håvarstein *et al.*, 1995; Wandersman, 1998; Gutiérrez, 2005; Martín, 2006). Generalmente, estos cuatro dominios se disponen como péptidos independientes aunque en ocasiones pueden unirse y actuar como un complejo polipeptídico. Por otro lado, la proteína accesoria posee una región N-terminal localizada en el citoplasma (aprox., 20 aa), un dominio central integral transmembrana y una región C-terminal orientada hacia el lado extracelular de la membrana citoplasmática y que conecta con el extremo N-terminal mediante un TMS (Franke, 1998). La función exacta de las proteínas accesorias aún no se ha determinado con exactitud, no obstante, en las bacterias Gram-positivas resultan imprescindibles para la secreción de algunas bacteriocinas (Skaugen *et al.*, 2003) y, en las Gram-negativas, serían las encargadas de conectar la membrana interna con la externa, por lo que se han denominado proteínas de fusión de membrana (Franke, 1998; Herranz, 2001; Gajic, 2003).

En las bacterias Gram-negativas, las proteínas o sustancias liberadas al espacio periplásmico por este sistema de secreción requieren de la presencia de un polipéptido de la membrana externa, lo que permitiría su paso del espacio periplásmico al exterior mediante la formación de un poro hidrófilo. Asimismo, estas proteínas secretadas carecen generalmente del SP en su región N-terminal (Fernández y de Lorenzo, 2001), salvo la colicina V (ColV), que posee una secuencia líder del tipo doble Gly-Gly (Håvarstein *et al.*, 1994).

Los transportadores del tipo ABC pueden clasificarse, con base en sus características funcionales, dentro de los siguientes grupos (Dassa y Bouige, 2001):

1. Internalizadores. En este grupo se incluyen transportadores específicos de procariotas cuya función es proveer de nutrientes esenciales a las bacterias, incluso si éstos se encuentran a muy pequeñas concentraciones en el medio extracelular. En este tipo de transportadores los cuatro dominios actúan por separado y requieren de la presencia de una proteína de unión al sustrato para que el transporte sea eficaz.
2. Exportalizadores: En este grupo se incluyen transportadores responsables de la secreción de sustancias nocivas y toxinas extracelulares, así como de la distribución de distintos compuestos de la membrana, tanto en procariotas como en eucariotas. En las bacterias, estos transportadores se encargan de la secreción de sustancias como: (i) antibióticos y compuestos no proteicos; (ii) precursores peptídicos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder, como ColV y la mayoría de la bacteriocinas sintetizadas por las bacterias lácticas; (iii) péptidos que carecen de extensión N-terminal, como la α -hemolisina de *E. coli*, EntEJ97, AurA70 y la bacteriocina LsbB y, probablemente, EntL50 (EntL50A y EntL50B) y EntQ y (iv) compuestos anfífilicos implicados en fenómenos de resistencia a muchos fármacos (Cintas *et al.*, 1998a, 2001; Gutiérrez, 2005). Este tipo de transportadores, además de los cuatro dominios que suelen fusionarse formando un único complejo polipeptídico, necesitan de una proteína accesoria y de una proteína de la membrana externa para ser funcionales en las bacterias Gram-negativas. Conviene destacar que el procesamiento y transporte de los antibióticos y de las bacteriocinas no modificadas postraduccionalmente, se realiza también mediante este tipo de transportadores.
3. Reguladores. En este grupo se incluyen transportadores, que carecen de dominios TMD, encargados de la regulación de procesos celulares como la reparación del ADN, la traducción de proteínas o la expresión de diversos genes.

Por otra parte, la mayoría de las bacteriocinas que se secretan mediante transportadores del tipo ABC se sintetizan con una secuencia líder del tipo Gly-Gly (sección II.3.4.7.1) (Fath y Kolter, 1993; Dassa y Bouige, 2001; Higgins, 2001), son específicos para cada bacteriocina y están constituidos por un transportador del tipo ABC y su proteína accesoria, cuyos genes son contiguos, se coexpresan y, además, se encuentran ligados generalmente al gen estructural y al de inmunidad formando un único operón (Nes *et al.*, 1996, 2002). No obstante, CbnBM1 producida por *C. piscicola* LV17 constituye un caso especial ya que, a pesar de que sus genes estructural y de inmunidad se localizan en el cromosoma, su síntesis depende de la presencia del plásmido pCP40 (61 kb), que codifica un transportador del tipo ABC y que contiene el gen estructural y de inmunidad de CbnB2 (Quadri *et al.*, 1994, 1997b; Saucier *et al.*, 1997). Así pues, *C. piscicola* LV17 constituye, además, un ejemplo de cepa productora de múltiples bacteriocinas que comparten el mismo mecanismo de transporte. A este respecto, conviene destacar que en las cepas productoras de múltiples bacteriocinas es común encontrar un único transportador del tipo ABC, implicado en el transporte de todas las bacteriocinas, si bien esto ocurre generalmente cuando sus precursores muestran una elevada homología en su secuencia líder (Eijsink *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003). Por otra parte, algunas bacteriocinas carentes de extensión

N-terminal, como es el caso de las bacteriocinas LsbA y LsbB (Gajic *et al.*, 2003), EntQ (Criado *et al.*, 2006a) y, probablemente, EntL50A y EntL50B (Criado, 2006), emplean para su secreción transportadores del tipo ABC con una función dual, es decir, responsables del transporte e inmunidad de estas bacteriocinas.

Los transportadores del tipo ABC de las bacteriocinas son homodímeros generalmente de proteínas de, aproximadamente, 700 aminoácidos, que difieren de los transportadores ABC descritos anteriormente en que poseen tres dominios: dominio central integral de membrana, dominio de unión del ATP y un dominio proteolítico exclusivo de este tipo de transportadores (Fath y Kolter, 1993; Håvarstein *et al.*, 1995; Schneider y Hunke, 1998; Young y Holland, 1999). A pesar de que, de forma general, los dominios de los transportadores bacterianos del tipo ABC constituyen un polipéptido codificado por un único gen, en ocasiones cada dominio está codificado por un gen y, por lo tanto, constituyen péptidos independientes (Håvarstein *et al.*, 1995). Asimismo, cada uno de los dominios que constituyen un transportador del tipo ABC desempeña una función particular: (i) dominio C-terminal, de unión al ATP y con actividad ATPasa (aprox., 250 aa), localizado en la cara interna de la membrana citoplasmática; (ii) dominio central integral de membrana (aprox., 300 aa), que posee carácter hidrófobo y contiene 4 ó 6 TMS y (iii) dominio N-terminal o proteolítico (aprox., 150 aa), con residuos conservados Cys e His, que está localizado en la cara interna de la membrana citoplasmática y que posee actividad proteolítica. La función del dominio N-terminal es el reconocimiento de la prebacteriocina para, posteriormente, hidrolizar la secuencia líder a nivel de los dos residuos Gly situados en su extremo N-terminal. Asimismo, para el procesamiento y transporte de algunas bacteriocinas es imprescindible la presencia de la proteína accesoria de membrana aunque su función exacta es desconocida (Schneider y Hunke, 1998; Young y Holland, 1999; Dassa, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Gajic, 2003).

Håvarstein *et al.* (1995) propusieron un modelo que explica el mecanismo de transporte de los precursores de bacteriocinas que contienen secuencias líder del tipo Gly-Gly, y que propone la unión de un precursor a cada uno de los dos dominios proteolíticos del homodímero del transportador del tipo ABC y la unión de dos moléculas de ATP en su dominio C-terminal, así como que la energía liberada por la hidrólisis del ATP induce un cambio conformacional en el transportador que tiene como resultado el procesamiento y la translocación del péptido a través de la membrana.

II.5.1.2. SISTEMA Sec

La principal ruta de translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática bacteriana es el sistema Sec. Los péptidos o proteínas que utilizan esta ruta se sintetizan como precursores o preproteínas con una extensión N-terminal del tipo SP (Pugsley, 1993; Casaus, 1998; Driessen *et al.*, 1998; Herranz, 2001; Driessen *et al.*, 2002; Gutiérrez, 2005), y las proteínas se procesan, transportan y secretan a través de la membrana citoplasmática mediante un complejo proteico denominado translocasa. Las preproteínas pueden dirigirse directamente a la translocasa, conducidas por chaperonas moleculares como SecB, o a través de una ruta en la que interviene la partícula reconocedora de señal (SRP, del inglés *Signal Recognition Particle*) (Fekkes y Driessen, 1999; van Wely *et al.*, 2001).

A continuación, se describen las características de este sistema, así como el mecanismo por el que las proteínas que contienen un SP atraviesan la membrana citoplasmática (translocación proteica). La mayoría de sus características y propiedades hacen referencia a *E. coli* puesto que su translocasa bacteriana es la más estudiada, aunque también se han descrito sistemas homólogos en *B. subtilis*, células eucariotas y arqueobacterias (Pöhlschroder *et al.*, 1997; van Wely *et al.*, 2001; Kuipers *et al.*, 2006).

II.5.1.2.1. Péptido y peptidasa señal

Con el objeto de asegurar una correcta aproximación y translocación a través de la membrana celular, los péptidos o proteínas son sintetizados con un SP que es eliminado o procesado proteolíticamente por peptidasas señal durante o poco después de la translocación (van Wely *et al.*, 2001). Los SPs son extensiones N-terminales de 18 a 30 aminoácidos que, aunque no manifiestan homologías en su secuencia primaria, poseen tres dominios característicos con propiedades físico-químicas comunes (Casaus, 1998; Franke, 1998; Fekkes y Driessen, 1999; Herranz, 2001; Mori e Ito, 2001; Gutiérrez, 2005; Kuipers *et al.*, 2006; Martín, 2006):

1. Dominio N, que consta de 1–5 aminoácidos y posee una carga neta positiva que es superior en los SPs de las bacterias Gram-positivas. Este dominio interacciona con la proteína SecA y con los fosfolípidos de carga negativa de la membrana citoplasmática, de modo que es importante para la entrada de las preproteínas en la ruta de translocación. Las preproteínas cuyo dominio N no posee una carga positiva son reconocidas por la translocasa, pero su transporte es más lento. Además, cuanto mayor es la carga neta positiva, los requerimientos de SecA para la translocación son menores, mientras que la interacción con SecA aumenta.
2. Dominio H, que está compuesto por 7–15 aminoácidos de naturaleza hidrofóbica y constituye la parte más importante del SP puesto que determina la eficacia de la translocación, de tal forma que cuanto mayor sea su longitud y su hidrofobicidad mayor será la eficiencia de translocación de la proteína. Esta estructura puede adoptar conformaciones en α -hélice que se extiende hasta el dominio N. Frecuentemente en la mitad de esta región se localiza un residuo de Gly o Pro que rompe la estructura de α -hélice de la zona, favoreciendo que el SP adopte una estructura similar a una “horquilla”, lo que permite insertarse en la bicapa lipídica.
3. Dominio C, que está integrado por 3–7 aminoácidos polares y que constituye la única zona del SP que necesita cierta especificidad en su estructura primaria, puesto que contiene el sitio de corte de la peptidasa señal que procesará al SP cuando éste comienza a separarse de la membrana plasmática, permitiendo la liberación de la proteína madura. Las peptidasas señal pueden ser de dos tipos: (i) peptidasas del tipo I, que actúan sobre proteínas y (ii) peptidasas del tipo II, que son específicas de lipoproteínas. Las peptidasas del tipo I poseen especificidad por aminoácidos en las posiciones –3 y –1, en relación al inicio de la parte madura de la proteína. A este respecto, estas posiciones están ocupadas generalmente por aminoácidos de cadenas laterales cortas y neutras, como Ala, Gly, Ser o Tre.

II.5.1.2.2. Proteína de reconocimiento SecB

Cuando una proteína provista del SP es sintetizada en el ribosoma puede alcanzar el complejo de translocación de dos formas distintas. En el primer caso, la preproteína se asocia directamente a la translocasa o es conducida hasta ella por la proteína SecB, mientras que, en otras ocasiones, la preproteína se asocia con SRP (Fig. 2.10). La proteína SecB es una chaperona citosólica que, hasta el momento, sólo se ha descrito en bacterias Gram-negativas. Esta proteína se une de forma no selectiva a la región madura de la preproteína y, de este modo, retarda su plegamiento y la mantiene en un estado competente para su translocación. Cuando SecB se une a la membrana citoplasmática posee una gran afinidad por SecA, lo que favorece el movimiento rápido y específico de los precursores proteicos hacia la membrana y su interacción con SecA (Herranz, 2001; Mori e Ito, 2001; Driessen *et al.*, 2002; Lewin, 2004; Gutiérrez, 2005, Martín, 2006; Rusch y Kendall, 2007).

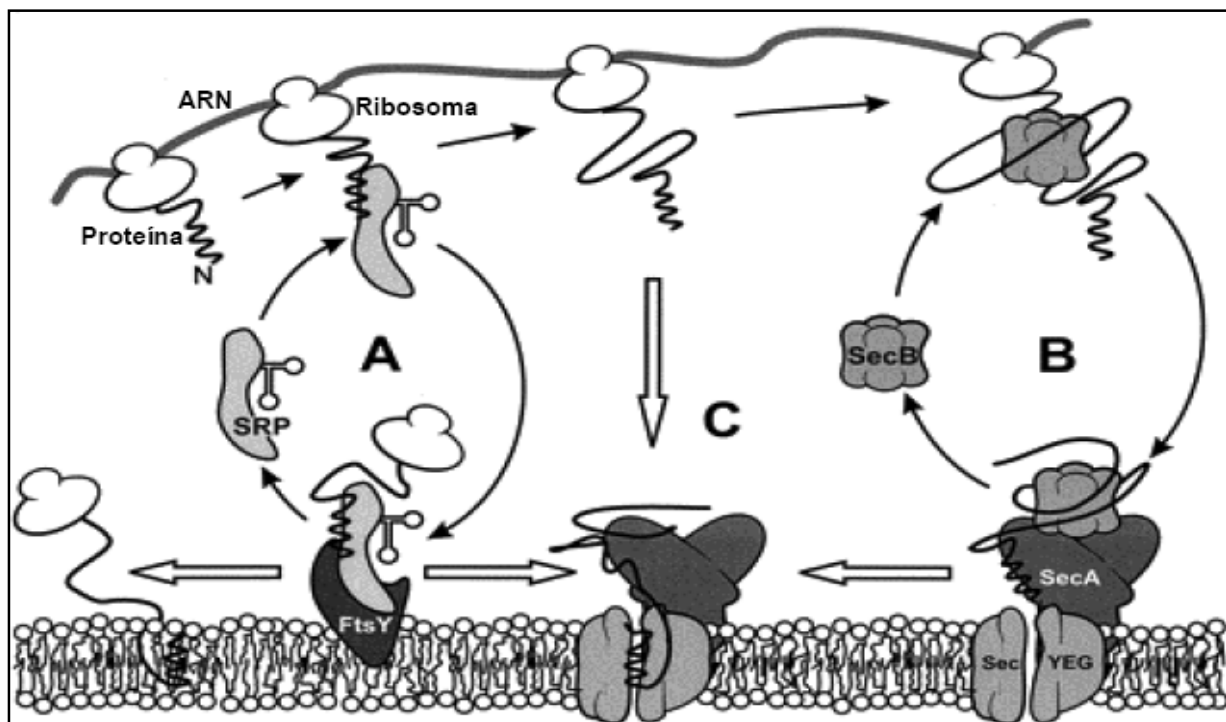


Figura 2.10. Secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas mediante el sistema Sec. Se han descrito tres rutas que dirigen la secreción de proteínas Sec-dependientes desde el citoplasma de *E. coli* hasta su espacio periplásmico: (A) cuando el SP de la preproteína es muy hidrófobo, SRP transporta el precursor hasta la proteína de membrana receptora (FtsY); posteriormente, la preproteína se transfiere al complejo de translocación para su secreción o, en otros casos, se incorpora a una ruta alternativa insertándose en la membrana; (B) alternativamente, la preproteína puede transportarse hasta la translocasa con la ayuda de SecB; para ello, la chaperona se une a la parte madura del precursor y, una vez que se localizan en la membrana, SecB expone conformacionalmente la preproteína a SecA; (C) en el caso de que la preproteína no sea reconocida por SRP ni por SecB, aquella puede alcanzar la membrana por sí misma. Adaptado de Fekkes y Driessen (1999).

II.5.1.2.3. SecA

SecA es una proteína con actividad ATPasa que desempeña un papel central en el mecanismo de translocación proteica al interconectar la hidrólisis del ATP con la translocación del precursor proteico a través de la membrana plasmática (Fig. 2.10) (Mori e Ito, 2001; van Wely *et al.*, 2001; Driessen y van

der Does, 2002; Rusch y Kendall, 2007). SecA se encuentra unida al complejo proteico de membrana y posee gran afinidad por SecB, el SP y la región madura de las preproteínas. Esta proteína con actividad ATPasa funciona como un homodímero en el que cada uno de sus monómeros está constituido por dos regiones de unión a nucleótidos (NBS, del inglés *Nucleotide-Binding Sites*): NBS1 y NBS2. NBS1 se localiza en el dominio N y posee una elevada afinidad por el ATP, mientras que NBS2 se sitúa en el dominio C y se encarga de controlar la hidrólisis del ATP en NBS1 (Sianidis *et al.*, 2001). La unión del precursor proteico a SecA estimula el intercambio de ADP por ATP en uno de sus dos sitios de unión al ATP y origina la inserción de SecA y de parte del precursor en la membrana. La hidrólisis del ATP permite la desinserción de SecA, así como la liberación de la preproteína y su entrada en la ruta de translocación (Franke, 1998; Herranz, 2001; Lewin, 2004).

II.5.1.2.4. Translocasa: complejo de membrana

Este dominio hexamérico está constituido por los polipéptidos SecY, SecE, SecG, SecD, SecF y YajC (Fig. 2.10). Las subunidades SecY y SecE son esenciales para el proceso de translocación y constituyen el núcleo de la translocasa; sin embargo, SecYE se une *in vivo* a otra proteína de membrana de pequeño tamaño, SecG, que aunque no es esencial, incrementa considerablemente la eficiencia del complejo de translocación SecYEG (Driessen *et al.*, 1998; Mori e Ito, 2001; Driessen y van der Does, 2002; Rusch y Kendall, 2007). El complejo SecYEG podría actuar como un poro de conducción de las preproteínas a través de la membrana citoplásmica y el complejo heterotrimérico SecDFYajC puede asociarse con el complejo SecYEG aumentando la eficacia del proceso de translocación. Aunque la función de este complejo no se conoce con exactitud, se ha propuesto su participación en: (i) el control de ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana, (ii) el mantenimiento de la PMF durante el proceso de translocación y (iii) la liberación de las proteínas translocadas (Herranz, 2001; Martín, 2006; Rusch y Kendall, 2007).

II.5.1.2.5. Mecanismo de translocación proteica

La translocación proteica no es un proceso espontáneo sino que requiere energía. A este respecto, las principales fuentes de energía son la hidrólisis del ATP, que es esencial para los ciclos de inserción-desinserción de SecA en la membrana, y la PMF que se encarga de suministrar energía en las etapas iniciales del proceso de translocación (Herranz, 2001; Gutiérrez, 2005; Martín, 2006).

La mayoría de las características y propiedades del sistema Sec hacen referencia a *E. coli*. No obstante, en la actualidad se tiene constancia de que existe una gran homología entre los componentes que intervienen en el proceso de translocación proteica en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, lo que sugiere funciones similares en ambos grupos de bacterias (van Welly *et al.*, 2001). A pesar de ello, las bacterias Gram-positivas poseen algunas diferencias, entre las que destacan las siguientes (Tabla II.15): (i) el dominio N del SP es de mayor tamaño, (ii) la peptidasa señal del grupo I contiene 5–7 aminoácidos más, (iii) las peptidasas actúan entre las posiciones 7 y 9 con respecto al final de la región C-terminal del dominio H, mientras que en las bacterias Gram-negativas actúan entre las posiciones 3 y 7, (iv) la ausencia de SecB, (v) la afinidad baja de SecA por algún componente del

complejo SecYEG, (vi) los niveles de SecA no se controlan mediante sistema de autorregulación, (vii) las proteínas del complejo de membrana son de menor tamaño y (viii) el gen *yajC* del complejo de membrana se encuentra en un operón distinto al de *secD* y *secF*.

Por otra parte, algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo SP (sección II.3.4.7.1), como es el caso de la acidocina B (Leer *et al.*, 1995), bacteriocina 32 (Inoue *et al.*, 2006), bacteriocina T8 (de Kwaadsteniet *et al.*, 2006), divergicina A (DivA) (Worobo *et al.*, 1995), EntP (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998; Herranz y Driessen, 2005), EnlA (Nilsen *et al.*, 2003) y Lci972 (Martínez *et al.*, 2000a), por lo que su procesamiento, transporte y secreción al medio extracelular tiene lugar probablemente a través del sistema Sec (Pugsley, 1993; van Wely *et al.*, 2001), como ya se ha demostrado en el caso de EntP (Gutiérrez *et al.*, 2005a, b, c; Herranz y Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006). En este sentido, Herranz y Driessen (2005) han observado que mutaciones del SP de EntP y el empleo de azida, un potente inhibidor de SecA, reduce drásticamente la secreción de EntP, lo que demuestra que esta bacteriocina se secreta mediante el sistema Sec. Por consiguiente, la organización de sus agrupaciones génicas es más simple, ya que carecen de un sistema de transporte dedicado, e incluye un único operón constituido por el gen estructural y de inmunidad (Leer *et al.*, 1995; Worobo *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 1997; Nilsen *et al.*, 2003).

Tabla II.15. Principales diferencias entre el sistema Sec de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas

Componentes	Bacterias Gram-negativas	Bacterias Gram-positivas
Péptido señal	De menor tamaño Dominio N de pequeña longitud	Presenta 5–7 aminoácidos más Dominio N de mayor extensión y con mayor carga positiva
Peptidasa señal	Reconoce y actúa en la zona comprendida entre las posiciones 3 y 7 con respecto al final de la región C-terminal del dominio H	Reconoce y actúa en la zona comprendida entre las posiciones 7 y 9 del dominio C con respecto al final de la región C-terminal del dominio H
SecB	Chaperona presente en todas las bacterias Gram-negativas	No se han encontrado proteínas homologas en bacterias Gram-positivas
SecA	Elevada afinidad por el complejo SecYEG de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas Niveles de SecA controlados por un mecanismo de autorregulación	Afinidad baja por alguno de los componentes del complejo SecYEG No poseen sistema de autorregulación
Complejo de membrana	Proteínas del complejo de gran tamaño Genes que codifican SecD, SecF y YajC en el mismo operón	Proteínas de menor tamaño y no intercambiables con las de bacterias Gram-negativas El gen <i>yajC</i> se sitúa en un operón distinto

Adaptado de van Wely et al. (2001) y Martín (2006).

II.5.2. PROCESAMIENTO, TRANSPORTE Y SECRECIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS EN LEVADURAS

En general, las proteínas de secreción sintetizadas por levaduras se procesan, transportan y secretan mediante el sistema Sec. Al igual que sucede con las bacterias, las proteínas que sintetizan las levaduras como precursores son reconocidas durante su traducción o postraduccionalmente (Ward, 1999). A este respecto, SRPs se encargan del reconocimiento de la preproteína en el momento de su traducción, mientras que la chaperona SecB interviene después de la traducción del precursor. Estas SRPs también forman parte del sistema Sec de las levaduras, aunque en este caso la chaperona

eucariótica Sec63 manifiesta diferencias estructurales significativas respecto a la chaperona procariótica SecB. Por otra parte, el complejo de translocación de las levaduras (complejo heterotrímero Sec61 $\alpha\beta\gamma$) es diferente del que poseen las bacterias (complejo SecYEG). No obstante, se ha observado que la proteína Sec61 α , que forma parte del complejo Sec61 de las levaduras, es similar a la proteína SecY del complejo de translocación procariótico (Cao y Saier, 2003). En levaduras, las proteínas sintetizadas con un SP son dirigidas hasta la membrana del retículo endoplasmático (RE) por las proteínas de reconocimiento de los tipos SRP o Sec63. Una vez que las proteínas alcanzan la membrana del RE, la atraviesan a lo largo del complejo de translocación Sec61 y, posteriormente, se procede a su transporte hasta el aparato de Golgi (AG). Una vez alcanzado el AG, las proteínas se incorporan a vesículas de secreción que se fusionan con la membrana citoplasmática, para que las proteínas alcancen el medio extracelular (Ward, 1999; Tsuchiya *et al.*, 2003) (Fig. 2.11.A).

Por otra parte, conviene destacar que no existe una secuencia consenso del SP reconocida como “secuencia general” o de “referencia” para la secreción de proteínas en levaduras. No obstante, un importante número de secuencias aminoacídicas, consideradas como SP y procedentes de proteínas sintetizadas por levaduras, ya han sido evaluadas por su posible utilidad como “señales” de procesamiento y secreción en diversos vectores de expresión (Cereghino y Cregg, 2000). En este contexto, el SP de la feromona factor α 1 de *Sc. cerevisiae* (MF α 1_s, del inglés *Mating Pheromone α -factor 1 Secretion Signal*) se ha convertido en una de las extensiones N-terminales más utilizadas para la secreción heteróloga de proteínas en levaduras (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1989, 1990; Cregg *et al.*, 1993). MF α 1 se sintetiza como una preproteína de 165 aminoácidos que contiene un SP de 83 aminoácidos y cuatro regiones que codifican MF α 1 (codificada por los aminoácidos contiguos lisina-arginina), y que preceden a los espaciadores, constituidos por la repetición de dos aminoácidos contiguos ácido glutámico-alanina (Glu-Ala). Probablemente, el SP y los espaciadores contienen la “señal”, formada por tres lugares de reconocimiento, necesaria para el procesamiento, transporte y secreción de proteínas en levaduras. Como se observa en la Fig. 2.11.B, los lugares de reconocimiento de su extremo N-terminal incluyen: (i) una peptidasa señal que actúa en RE; (ii) una zona reconocida por endopeptidasas (endopeptidasa Kex2) y (iii) una zona reconocida por exopeptidasas (exopeptidasa Ste 13) (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1989, 1990). Finalmente, la eficiencia de las proteínas Kex2 y Ste13 puede ser afectada por la secuencia de aminoácidos (por ej.: residuos Pro) presentes en las proximidades de estos lugares de reconocimiento (Cereghino y Cregg, 2000).

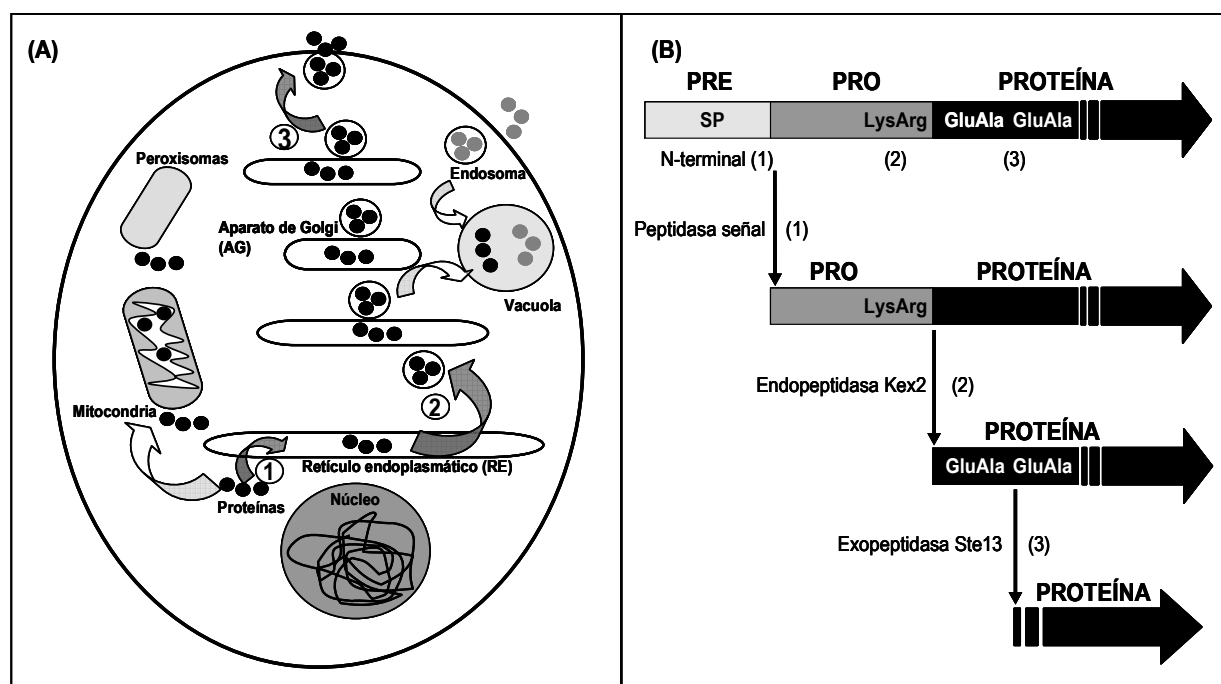


Figura 2.11. (A) Mecanismo de procesamiento, transporte y secreción de proteínas en levaduras. Las proteínas sintetizadas como precursores preproteína se dirigen hasta la membrana de RE con la ayuda de proteínas de reconocimiento (1). Una vez alcanzan la membrana de RE, la atraviesan mediante un complejo de translocación. Posteriormente, las proproteínas alcanzan AG, en el que son incorporadas a “vesículas de secreción” (2). Finalmente, las “vesículas de secreción” se fusionan con la membrana citoplasmática para que las proteínas se liberen al medio extracelular (3). No obstante, las proteínas citoplasmáticas pueden utilizar rutas alternativas (indicadas con flechas blancas). **(B) Reconocimiento del SP y lugar de procesamiento de MFα1 de *Sc. cerevisiae*.** Inicialmente, el SP del extremo N-terminal de la preproteína de secreción es reconocida por proteínas de reconocimiento e incorporada al interior de RE (1). Cuando la proproteína llega a AG, se realiza la separación del extremo N-terminal del resto de la proteína. En esta separación intervienen endopeptidasas que reconocen a los residuos contiguos lisina-arginina (2). Finalmente, en el momento de su secreción, la proteína se hidroliza por exopeptidasas que reconocen el lugar de procesado constituido por la repetición de dos aminoácidos contiguos Glu-Ala (3). Adaptado de Gutiérrez (2005).

II.6. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS

Como se ha descrito anteriormente (sección II.2.2.1), las bacteriocinas son péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) (Joerger *et al.*, 2000; O’Keeffe y Hill, 2000; Cintas *et al.*, 2001; Hill y O’Keeffe, 2003). Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas han recibido una atención especial, y se ha propuesto que las de origen alimentario y/o las correspondientes cepas bacteriocinogénicas, combinadas con otras barreras antimicrobianas (sección II.3.4.10), podrían contribuir a asegurar la estabilidad, seguridad y calidad higiénico-sanitaria de muchos alimentos, si bien, existen factores que limitan su utilidad como bioconservantes alimentarios, tales como: (i) su reducido espectro de acción antimicrobiana, (ii) el bajo nivel de producción y un rendimiento de recuperación de los protocolos de purificación bajo e insuficiente, (iii) la obligatoriedad de emplear exclusivamente cepas bacteriocinogénicas consideradas

como microorganismos GRAS y/o QPS, (iv) la escasa adaptación de algunas cepas bacteriocinogénicas disponibles a algunos sustratos alimentarios de interés, (v) la pérdida espontánea de la capacidad para producir bacteriocinas, (vi) los posibles efectos adversos de estas cepas en las características organolépticas de los alimentos y/o (vii) el desarrollo de bacterias resistentes a las bacteriocinas. Por todo ello, la producción de bacteriocinas por hospedadores heterólogos (no bacteriocinogénicos de forma natural, pero bien adaptados a un alimento determinado y/o con propiedades tecnológicas relevantes) que pudieran emplearse como cultivos iniciadores y/o protectores de los alimentos constituye en la actualidad una alternativa atractiva y válida que permitiría evitar algunos de los factores limitantes mencionados anteriormente. De forma general, los sistemas de expresión heteróloga se emplean para: (i) conocer la función y/o el modo de acción de ciertas proteínas y péptidos, (ii) facilitar el control transcripcional y/o traduccional sobre la expresión del gen recombinante y/o (iii) conseguir un nivel de producción mayor que el de las cepas salvajes (Makrides, 1996). En este contexto, la producción heteróloga de bacteriocinas permitiría: (i) conocer la función de las proteínas codificadas por los genes de biosíntesis de las bacteriocinas, (ii) incrementar la producción de bacteriocinas, (iii) producir bacteriocinas en hospedadores más seguros, (iv) construir cepas productoras de varias bacteriocinas con un amplio espectro de acción antimicrobiana que puedan impedir el desarrollo de bacterias resistentes a las bacteriocinas, (v) mejorar la adaptación de los hospedadores seleccionados para su implantación y desarrollo en diversos sustratos alimentarios y (vi) conferir una actividad antimicrobiana mayor o más específica a bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores, protectores y/o probióticos (Fernández *et al.*, 2005a, b; Gutiérrez, 2005; Criado, 2006; Martín, 2006).

Por todo ello, la clonación, producción y expresión funcional de bacteriocinas en hospedadores heterólogos posee un gran interés científico y aplicado. Sin embargo, el diseño de un sistema de expresión eficiente para la producción de proteínas o péptidos depende de numerosos factores, entre los que se incluyen: (i) características del hospedador heterólogo; (ii) elementos genéticos utilizados (por ej.: vector de expresión, región promotora, lugar de unión al ribosoma y señales de transcripción y traducción); (iii) existencia de posibles modificaciones postraduccionales; (iv) localización y nivel de producción y expresión funcional del producto final y/o (v) ausencia de efectos tóxicos del producto final sobre el hospedador (Makrides, 1996). Generalmente, los sistemas de expresión heteróloga de proteínas han utilizado *E. coli* como hospedador, ya que es el microorganismo mejor caracterizado genéticamente y existen numerosas herramientas genéticas disponibles para su manipulación. No obstante, su empleo para la producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas con fines alimentarios presenta limitaciones (por ej.: diferencias en el código genético, toxicidad, proteolisis y dificultad de secreción) e inconvenientes (microorganismo no considerado GRAS y potencialmente patógeno), por lo que es conveniente emplear otros hospedadores de origen alimentario que posean un adecuado potencial tecnológico (Fernández *et al.*, 2005a). Las bacterias lácticas constituyen un hospedador adecuado, ya que generalmente se consideran microorganismos GRAS. A este respecto, ciertas cepas de *Lc. lactis* constituyen los hospedadores más adecuados ya que: (i) se ha secuenciado completamente su genoma, (ii) secretan un número muy reducido de proteínas, (iii) tienen escasa

actividad proteolítica y (iv) existen numerosas herramientas genéticas para su manipulación (Fernández *et al.*, 2005a). Por otra parte, diversas especies de levaduras (por ej.: *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris*) también resultan interesantes como hospedadores heterólogos de bacteriocinas con fines alimentarios, ya que se les pueden aplicar las técnicas de manipulación genética de procariotas y, además, gozan de la versatilidad de los sistemas eucariotas (Fernández *et al.*, 2005a, b), si bien algunos de los escasos estudios descritos hasta la fecha han puesto de manifiesto ciertas limitaciones (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a).

En un primer momento, la producción de bacteriocinas en hospedadores heterólogos se basó en la clonación de los genes responsables de su síntesis, procesamiento, transporte y secreción en diferentes vectores de expresión, lo que permitió la producción de PedPA-1 en *E. coli* (Marugg *et al.*, 1992), de LciA en *P. acidilactici* PAC1.0 y de PedPA-1 en *Lc. lactis* (Chikindas *et al.*, 1995), y de EntA en *E. faecalis* OG1X y *Lc. lactis* IL1403 (O’Keeffe *et al.*, 1999). No obstante, el hecho de que la mayoría de las bacteriocinas se sintetizan como precursores con una extensión N-terminal de elevada homología en su secuencia aminoacídica y con un lugar de procesamiento del tipo Gly-Gly, permitió hipotetizar que las señales de procesamiento, transporte y secreción de las bacteriocinas podrían ser intercambiables y funcionales para muchas de ellas (Allison *et al.*, 1995a, b). Esta hipótesis se demostró con la producción heteróloga de la lactacina F (LtaF) por *Le. gelidum* UAL187-22 empleando el sistema de transporte y secreción de LeuA (Allison *et al.*, 1995b), con la producción de LciA con el sistema de procesamiento, transporte y secreción de LeuA (van Belkum y Stiles, 1995) y con la producción de MesY105 por *Lactobacillus johnsonii* (Fremaux *et al.*, 1995). Por otra parte, Axelsson *et al.* (1998) han desarrollado un sistema de expresión que requiere la utilización de dos plásmidos complementarios, uno que contiene los genes necesarios para la inducción del promotor de SakA, así como los que intervienen en su procesamiento y secreción, y el otro que contiene los genes estructurales y de inmunidad de la bacteriocina de interés bajo el control del promotor de SakA. Asimismo, el conocimiento de que la síntesis de NisA en *Lc. lactis* se encuentra regulada por un inductor (NisA), que activa la transcripción de los genes involucrados en su síntesis, procesamiento y secreción, ha permitido el desarrollo de sistemas de expresión controlados por esta bacteriocina (sistema NICE, del inglés *Nisin Controlled Expression*). Estos sistemas han demostrado su utilidad en la expresión de diversas proteínas y péptidos en diferentes bacterias lácticas (de Ruyter *et al.*, 1996; Kleerebezem *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998), de forma que la construcción de nuevos vectores de expresión controlados por NisA y que contengan los genes de la biosíntesis de péptidos bajo el control del promotor inducible de NisA pueden permitir la producción de diversas bacteriocinas en otros hospedadores (Bryan *et al.*, 2000).

Por otra parte, algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas se sintetizan con una extensión N-terminal del tipo SP (sección II.3.4.7.1), por lo que su procesamiento, transporte y secreción al medio extracelular ocurre probablemente a través del sistema Sec, en lugar de un sistema de transporte dedicado (DTS) (Pugsley, 1993; van Wely *et al.*, 2001), como ya se ha demostrado para EntP (Gutiérrez *et al.*, 2005a, b, c; Herranz y Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006). Por ello, una alternativa de especial interés en la producción heteróloga de bacteriocinas sería el empleo de un

sistema general de procesamiento, transporte y secreción basado en la sustitución de la secuencia líder de la bacteriocina de interés por un SP de bacteriocinas Sec-dependientes. A este respecto, se ha logrado la producción heteróloga de DivA, una bacteriocina Sec-dependiente producida por *C. divergens* (Worobo *et al.*, 1995), por cepas de *C. piscicola* y *Lc. lactis* transformadas con plásmidos que contenían el gen estructural y de inmunidad de dicha bacteriocina. Posteriormente, la transformación de *C. divergens*, *C. piscicola* y *Lc. lactis* con un vector de expresión que contenía la fusión entre el SP de DivA con la proteína madura de CbnB2 o de ColV permitió la coproducción de ambas bacteriocinas en la misma cepa (McCormick *et al.*, 1996, 1998). Por otra parte, Gutiérrez *et al.* (2005a, b, c, 2006) han evaluado la producción y expresión funcional de EntP, producida por *E. faecium* P13, en *E. coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Pc. pastoris* y *Lc. lactis* subesp. *lactis* y *Lc. lactis* subesp. *cremoris*, con resultados prometedores acerca de su potencial como modelo experimental de clonación, producción y expresión funcional de muchas otras bacteriocinas y/o péptidos en hospedadores de interés en la industria alimentaria. Recientemente, se ha demostrado que la fusión de PedPA-1, producida por *P. acidilactici* PLBH9, y de EntA, producida por *E. faecium* PLBC21, con el SP de EntP permite la producción de estas bacteriocinas en cepas de *Lc. lactis* y la coproducción de NisA y estas bacteriocinas en *Lc. lactis* subesp. *lactis* DPC5598 (Martín *et al.*, 2007a, b). Asimismo, Liu *et al.* (2008) también han producido y expresado heterológamente EntA en cepas de *Lc. lactis*. Por otra parte, Fernández *et al.* (2007) han producido y expresado heterológamente EntAS-48, producida por *E. faecalis* S-48, en cepas de *E. faecium*, sin embargo, no fue posible la producción y expresión de esta enterocina en cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

La tendencia actual en la producción heteróloga de bacteriocinas con fines alimentarios es el empleo de vectores de “grado alimentario” en hospedadores seguros y de utilidad contrastada (Kuipers *et al.*, 1997, 1998; de Vos, 1999a; Fernández *et al.*, 2005b; Gutiérrez, 2005; Criado, 2006; Martín, 2006). A este respecto, de Vos (1999a) propuso que los denominados “sistemas de grado alimentario” deberían estar constituidos por vectores que contengan ADN procedente de un hospedador heterólogo considerado GRAS. En general, los sistemas de grado alimentario se clasifican en tres grandes grupos: (i) sistemas de expresión controlados, (ii) sistemas que emplean marcadores de selección y (iii) sistemas de integración cromosómica (de Vos, 1999a). Los sistemas de expresión controlados se presentan como una importante “herramienta” ya que permiten que el gen clonado se exprese independientemente del desarrollo del hospedador (Kuipers *et al.*, 1997). Actualmente, se dispone de un gran número de sistemas de expresión que inducen la transcripción controlada de genes en bacterias lácticas (de Vos, 1999a). No obstante, de los sistemas de expresión controlados descritos hasta la fecha, el más exitoso y utilizado es el conocido como sistema NICE (Lin *et al.*, 1998). Entre las ventajas de este sistema para la producción de péptidos o proteínas en bacterias lácticas destacan: (i) su flexibilidad, puesto que la relación dosis-respuesta entre la concentración del inductor (NisA) y la producción de la proteína de interés es lineal; (ii) su inducción controlada, fácil y de bajo coste, ya que no requiere la utilización de NisA purificada y puede realizarse directamente con el sobrenadante de una cepa productora de NisA; (iii) la elevada transcripción génica mediada por el promotor inducible, lo que permite la producción del péptido fusionado o proteína de interés en cantidades elevadas; (iv) su

aplicación, ya que también puede utilizarse para detectar pequeñas concentraciones de NisA en sustratos alimentarios, y (v) su versatilidad, puesto que puede emplearse para la expresión controlada del gen de interés en un gran número de bacterias lácticas (Kleerebezem *et al.*, 1997; Eichenbaum *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 1998; de Vos, 1999b; Neu y Henrich, 2003). En lo que respecta a los sistemas basados en la utilización de marcadores de selección, éstos se clasifican en tres grupos en función del tipo de marcador utilizado: (i) marcadores basados en el empleo de azúcares (de Vos, 1999a); (ii) marcadores auxotróficos, es decir, basados en la supresión de la expresión de un determinado gen que codifica la síntesis de componentes necesarios para la supervivencia celular (Dickely *et al.*, 1995; Sørensen *et al.*, 2000; Bron *et al.*, 2002; Glenting *et al.*, 2002) y (iii) marcadores que confieren resistencia o inmunidad a sustancias consideradas como seguras (de Vos, 1999a) como, por ejemplo, LtaF (Allison y Klaenhammer, 1996) o NisA (Hughes y McKay, 1991; Takala y Saris, 2002). Conviene destacar que la mayoría de los sistemas de expresión heteróloga utilizan vectores con marcadores de selección, a pesar de que presentan el inconveniente de requerir una presión selectiva constante. Sin embargo, estos inconvenientes podrían reducirse mediante la utilización de sistemas de integración cromosómica, desarrollados y utilizados por algunos investigadores para la expresión de genes y la producción de péptidos y proteínas recombinantes en *Lc. lactis* (Leenhouts *et al.*, 1998) y *Lb. casei* (Gosalbes *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000). Por otra parte, casi todas las bacterias lácticas utilizadas como hospedadores heterólogos para la producción de péptidos y proteínas recombinantes pertenecen al grupo de las denominadas “cepas de laboratorio”, que servirían de ayuda y referencia en los primeros ensayos pero que, una vez evaluados los resultados obtenidos, deberían sustituirse por cepas de utilidad industrial (Ryan *et al.*, 1996; Buyong *et al.*, 1998; Coffey *et al.*, 1998; Hickey *et al.*, 2001; Johansen, 2003).

De lo descrito anteriormente, puede destacarse que la futura aplicación práctica de las bacteriocinas producidas por hospedadores heterólogos debería considerar la utilización de vectores de “grado alimentario” y hospedadores seguros y de utilidad contrastada en la industria alimentaria. No obstante, resulta de gran importancia el desarrollo, la evaluación y optimización de cualquier sistema de clonación, producción heteróloga y expresión funcional de bacteriocinas antes de su aplicación práctica, especialmente en lo que respecta a los niveles de producción y la actividad biológica de las bacteriocinas secretadas heterológamente.

II.6.1. PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE BACTERIOCINAS EN LEVADURAS

Las levaduras combinan la facilidad de su manipulación genética y las características de crecimiento de los procariotas con los mecanismos de modificación postraduccional de los eucariotas. Por ello, diversas especies de levaduras se consideran potencialmente útiles como sistemas de producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés biotecnológico (Cregg *et al.*, 1993).

La primera levadura descrita como sistema de producción heteróloga de proteínas y péptidos es *Sc. cerevisiae* (Cregg *et al.*, 1993), ya que, al igual que *E. coli*, *Sc. cerevisiae* es uno de los microorganismos mejor caracterizados genética y fisiológicamente. Asimismo, la consideración de la

mayoría de las cepas como microorganismos seguros para las personas favorece su elección como hospedador para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés. Además, en los últimos años se han desarrollado plásmidos y vectores de integración cromosómica y diversos promotores (por ej.: alcohol deshidrogenasa y Cup-1) y SPs (por ej.: MF α 1_s) que permiten la expresión y secreción de proteínas, intrínsecas y extrínsecas a la levadura, al medio extracelular (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1989, 1990; Bardazzi y Casalone, 2004; Schuller y Casal, 2005; Cebollero *et al.*, 2007). A este respecto, en un trabajo reciente Schuster *et al.* (2000) han expresado y/o secretado 20 proteínas en *Sc. cerevisiae* empleando dos plásmidos diferentes: (i) YE α -Flag-1, que permite la expresión y secreción de proteínas bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa y de MF α 1_s y (ii) Y α -B, que permite la expresión de proteínas bajo el control del promotor Cup-1. Asimismo, Parolin *et al.* (2005) han expresado cinco antígenos del virus de la hepatitis C en tres cepas de *Sc. cerevisiae* empleando dos vectores diferentes bajo el control del promotor TPI (del inglés *Triose Phosphate Isomerase*): (i) vector de integración pYX012 y (ii) vector de expresión pYX212. A pesar de estos resultados, la utilización de *Sc. cerevisiae* como hospedador heterólogo no siempre se considera ideal para la producción de proteínas recombinantes. En este contexto, el empleo de levaduras metilotróficas supone una alternativa frente a los inconvenientes de *Sc. cerevisiae*, derivados de: (i) su bajo nivel de producción, (ii) su inestabilidad, (iii) su alto grado de glucosilación y/o (iv) su difícil adaptación a ensayos de tipo industrial (Hollenberg y Gellissen, 1997).

De entre las levaduras metilotróficas, *Pc. pastoris* es el microorganismo más utilizado como modelo para el desarrollo de sistemas de producción heteróloga de proteínas. Este sistema de producción heteróloga ha ganado popularidad en los últimos años debido a una serie de factores, entre los que destacan: (i) la simplicidad de las técnicas para su manipulación genética, (ii) la habilidad para producir, intracelularmente o extracelularmente, grandes cantidades de proteína recombinante, (iii) la capacidad para desarrollar modificaciones postraduccionales en las proteínas recombinantes y (iv) la disponibilidad de sistemas de expresión heteróloga comerciales (Cereghino y Cregg, 1999, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Asimismo, existen numerosos plásmidos que permiten la expresión intracelular o extracelular de proteínas en *Pc. pastoris*, entre los que destacan pPICZ α (A, B, C), pHIL-D2, pHIL-S1, pPIC3.5 y pPIC9. Estos plásmidos contienen el gen *AOX1* que les permite integrarse, previa linearización, en el cromosoma de esta levadura. Además, la mayoría de estos plásmidos están bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa, no obstante, algunos promotores permiten obtener, en determinadas circunstancias, mejores resultados, entre los que destacan: (i) promotor constitutivo GAP (del inglés *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*); (ii) promotor FLD1, inducible por metanol o metilamina; (iii) promotor PEX8, inducible por metanol y (iv) promotor constitutivo YPT1. Asimismo, estos plásmidos emplean diversos SPs (por ej.: MF α 1_s, PHO1, SUC2 y PHA-E) para la expresión y secreción de las proteínas al medio extracelular (Cereghino y Cregg, 1999, 2000; Cereghino *et al.*, 2002; Carresi *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006; Muraki, 2006; Li *et al.*, 2007). Por todo ello, de forma general, la utilización de *Pc. pastoris* como hospedador heterólogo permite obtener buenos resultados de producción de proteínas recombinantes y la adaptabilidad de los ensayos de laboratorio a situaciones de tipo industrial (Cregg *et al.*, 1993; Cereghino y Cregg, 2000).

En lo que respecta a la producción heteróloga de bacteriocinas en levaduras (Tabla II.16), Schoeman *et al.* (1999) han descrito la producción heteróloga de PedPA-1 de *P. acidilactici* PAC1.0 por *Sc. cerevisiae*. Para ello, estos investigadores utilizaron un vector de expresión (YE_p352) en el que PedPA-1 está fusionada a *MFαI_s* de *Sc. cerevisiae* y su expresión bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa. La transformación de *Sc. cerevisiae* con el plásmido recombinante permitió la producción de PedPA-1 biológicamente activa. No obstante, la actividad antimicrobiana de PedPA-1 en los sobrenadantes de los cultivos de las levaduras recombinantes fue muy reducida y sólo se detectó en los sobrenadantes concentrados, lo que se atribuyó a que la bacteriocina se mantenía asociada a la membrana o a la pared celular de las células productoras. Asimismo, la ausencia de técnicas analíticas fiables para la detección y cuantificación de PedPA-1 en los sobrenadantes de los cultivos productores no permitió determinar la relación entre PedPA-1 producida y su actividad biológica, probablemente disminuida por una posible glucosilación de su molécula, la actividad de enzimas proteolíticas, la agregación entre sí o a otras moléculas u otras razones bioquímicas o biofísicas. Recientemente, van Reenen *et al.* (2003) han expresado Plt423 de *Lb. plantarum* 423 en *Sc. cerevisiae*, observándose las mismas limitaciones que las encontradas por Schoeman *et al.* (1999).

Tabla II.16. Bacteriocinas de bacterias lácticas producidas heterológamente por levaduras

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor	Hospedador heterólogo	Actividad antimicrobiana ^a		Referencia
				Medio sólido	Medio líquido	
Pediocina PA-1	IIa	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>Sc. cerevisiae</i>	+	+ ^b	Schoeman <i>et al.</i> (1999)
Plantaricina 423	IIa	<i>Lb. plantarum</i> 423	<i>Sc. cerevisiae</i>	+	+ ^b	Van Reenen <i>et al.</i> (2003)
Enterocina P	IIa	<i>E. faecium</i> P13	<i>Pc. pastoris</i>	+	+	Gutiérrez <i>et al.</i> (2005a)
Pediocina PA-1	IIa	<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	<i>Pc. pastoris</i>	N.D.	-	Beaulieu <i>et al.</i> (2005)
Hiracina JM79	IIa	<i>E. hirae</i> DCH5	<i>Pc. pastoris</i>	+	+	Sánchez <i>et al.</i> (2008)

^aLos símbolos + y – representan presencia y ausencia de actividad antimicrobiana, respectivamente. N.D., no determinado.

^bLa actividad antimicrobiana únicamente se detectó empleando un sobrenadante concentrado del cultivo correspondiente.

Por otra parte, los trabajos realizados para la producción heteróloga de bacteriocinas en *Pc. pastoris* han mostrado resultados contradictorios (Tabla II.16) (Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a; Sánchez *et al.*, 2008). Así pues, Gutiérrez *et al.* (2005a) han descrito la producción heteróloga de EntP, producida por *E. faecium* P13, en *Pc. pastoris* mediante la clonación de la región génica que codifica EntP madura en el plásmido pPICZαA, en el mismo marco de lectura que *MFαI_s* de *Sc. cerevisiae*, pero sin los espaciadores Glu-Ala adyacentes al lugar de procesamiento de la endopeptidasa Kex2, y bajo el control del promotor inducible del enzima de la alcohol oxidasa. La transformación de *Pc. pastoris* con el plásmido recombinante se tradujo en la obtención de una levadura recombinante que mostró una actividad biológica mayor a la obtenida por *E. faecium* P13. Para la detección y cuantificación de la producción de EntP se emplearon anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a EntP (Gutiérrez *et al.*, 2004), observándose que la producción de la levadura recombinante era 2,6 y 3,7 veces mayor que la producida por *E. faecium* P13 (Gutiérrez *et al.*, 2005a). Por otra parte, Sánchez *et al.* (2008) han expresado la hiracina JM79 de *E. hirae* DCH5 en *Pc. pastoris* empleando el mismo protocolo descrito por Gutiérrez *et al.* (2005a). Para la detección y cuantificación de la producción de la hiracina JM79 se emplearon anticuerpos de especificidad predeterminada frente a esta bacteriocina, observándose que la producción de la levadura recombinante era 2 y 5 veces mayor

que la producida por *E. hirae* DCH5. A pesar de ello, la actividad antimicrobiana de estas levaduras recombinantes sólo representó un 33 y un 76% de la máxima actividad antimicrobiana de la cepa salvaje. Finalmente, Beaulieu *et al.* (2005) han expresado PedPA-1 de *P. acidilactici* PAC1.0 en *Pc. pastoris*. El empleo de anticuerpos de especificidad predeterminada frente a PedPA-1 permitió determinar que la producción de esta bacteriocina por la levadura recombinante era 12 veces mayor que la producida por la cepa salvaje, no obstante, no se detectó su actividad antimicrobiana en los sobrenadantes de los cultivos productores, especulándose con la posibilidad de que PedPA-1 permaneciera asociada a material colágeno producido por la levadura, lo que interferiría con su actividad biológica (Beaulieu *et al.*, 2005).

CAPÍTULO III/ CHAPTER III

Actividad antimicrobiana de *Enterococcus faecium* L50, una cepa productora de las enterocinas L50 (L50A y L50B), P y Q, frente a bacterias lácticas alterantes de la cerveza en medio de cultivo, mosto cervecero (con y sin lúpulo) y cervezas con y sin alcohol

Antimicrobial activity of Enterococcus faecium L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer-spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers

(Manuscrito aceptado para su publicación en *International Journal of Food Microbiology*. Ref. N° FOOD-D-07-00582)

III.1. ABSTRACT

Enterococcus faecium L50 produces enterocin L50 (EntL50 [EntL50A and EntL50B]), enterocin P (EntP) and enterocin Q (EntQ) and displays a broad antimicrobial spectrum against the most relevant beer-spoilage lactic acid bacteria (LAB) (*i.e.*, *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus damnosus*), which is mainly due to the production of EntL50 (EntL50A and EntL50B). Moreover, bacteriocin assays using *in vitro* synthesized EntL50 (EntL50A and EntL50B) showed that both individual peptides possess antimicrobial activity on their own, being EntL50A the most active, but when the two peptides were combined a synergistic effect was observed. It is noteworthy that *E. faecium* L50 may be considered as a virulent strain since the only virulence genes detected were *efaA_{fm}* (cell wall adhesin) and *ccf* (sex pheromone), and this strain was susceptible to most clinically relevant antibiotics, such as ampicillin, penicillin, vancomycin and gentamycin. On the other hand, *E. faecium* L50 survived but did not grow nor showed antimicrobial activity in hopped and unhopped wort, and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) commercial lager beers. However, when unhopped wort was supplemented with 50% (vol/vol) MRS broth, *E. faecium* L50 grew and produced antimicrobial activity similarly as in MRS broth. Furthermore, the enterocins produced by this strain were bactericidal (5 log decrease) against *Lb. brevis* and *P. damnosus* in a dose- and substrate-dependent manner when challenged in MRS broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers at 32°C, and no bacterial resistances were detected even after incubation for 6–15 days. In addition, the enterocins in wort and lager beer (5% ethanol, vol/vol) withstood the heat treatments commonly employed in the brewing industry for mashing (consecutive heating at 45, 62, 72 and 78°C for 30 min, in unhopped wort), boiling (100°C for 90 min, in hopped wort), fermentation (15°C for 6–10 days, in hopped wort), and pasteurization (65°C for 40 min and 75°C for 10 min, in lager beer), and retained most of their antimicrobial activity in lager beer (5% ethanol, vol/vol) after long-term storage at 8 and 25°C. Taken together, these results showed the suitability of bacteriocins from *E. faecium* L50, mainly EntL50 (EntL50A and EntL50B), as beer-biopreservatives at various stages of the brewing process to control beer-spoilage by LAB.

III.2. INTRODUCTION

Beer is a low-alcohol beverage (1–10% ethanol, vol/vol) made through the fermentation of barley wort (either alone or mixed with maize, rice, wheat, etc.) by the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces carlsbergensis*, with the addition of hop (*Humulus lupulus* L.) and/or hop extracts. The general brewing process consists of five stages: (i) malting (germination of barley); (ii) mashing (extraction and hydrolysis of the components of malt and, if any, other cereals, followed by separation of non-soluble components); (iii) wort boiling (addition of the hop and hop extracts); (iv) fermentation (commonly divided into primary or main fermentation and lagering or secondary fermentation); and (v) down-stream processing (filtration, stabilization, pasteurization, bottling, etc.) (Linko *et al.*, 1998).

Beer has been recognized for centuries as a safe beverage, being difficult to spoil and having a remarkable microbiological stability, since it constitutes an unfavourable medium for the growth of most microorganisms due to the presence of ethanol (1–10%, vol/vol), hop bitter compounds (*ca.*, 17–55 ppm of iso- α -acids), high content of carbon dioxide (*ca.*, 0.5%, vol/vol), the low pH (3.8–4.7), the extremely reduced content of oxygen (<0.1 ppm), and the presence of extremely low concentrations of nutritive substances such as glucose, maltose and maltotriose (Jespersen and Jakobsen, 1996; Sakamoto and Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005). Moreover, the brewing industries use additional safety measures to prevent the growth of beer-spoilage microorganisms, which are based on extrinsic factors, such as refrigeration, pasteurization, filtration, sulfitation, etc. (Vaughan *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 2006). In spite of that, few microorganisms still manage to grow in beer, including some LAB such as *Lb. brevis*, *Lb. lindneri* and *P. damnosus* (Jespersen and Jakobsen, 1996; Sakamoto and Konings, 2003; March *et al.*, 2005). LAB can be found at almost every stage of the malting and brewing process and are recognized as the most hazardous bacteria for breweries, being responsible for approximately a 70% of the microbial beer-spoilage incidents, which negatively affect the product quality and produce millionaire economic losses for the brewing industry (Back, 1994; Jespersen and Jakobsen, 1996; Sakamoto and Konings, 2003; March *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2005). *Lactobacillus* species can spoil beer during the fermentation process by producing an excess of turbidity and acidity as well as off-odours such as those conferred by diacetyl and hydrogen sulfide (Fernandez and Simpson, 1995; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto and Konings, 2003). The so-called “sarcina-sickness” is caused by *Pediococcus* species and is characterized by turbidity, granular sediments, an excess of acidity and increased levels of diacetyl. Besides, some *Pediococcus* species also produce “ropiness” (a complex polysaccharide slime) and haze in the final product (Hartnett *et al.*, 2002).

Despite these detrimental metabolic activities for the brewing industries, some LAB may play a positive role in the brewing process by eliminating undesirable microorganisms, such as beer-spoilage LAB, and by contributing to wort bioacidification (Lewis, 1998; Vaughan *et al.*, 2005). LAB may account for food biological preservation mainly by the production of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides referred to as bacteriocins (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Diep and Nes, 2002; Cotter *et al.*, 2005b). Bacteriocins produced by LAB constitute a large and heterogeneous group of peptides or proteins displaying antimicrobial activity against a broad range of Gram-positive bacteria, including spoilage and food-borne pathogenic microorganisms (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). LAB bacteriocins may be categorized into three classes: (I) the lantibiotics, or posttranslationally modified peptides; (II) the non-modified, small, heat-stable peptides; and (III) the large, heat-labile protein bacteriocins. Class II bacteriocins are further grouped into three subclasses: (i) the subclass IIa (pediocin-like bacteriocins containing the N-terminal conserved motif YGNGVxC), (ii) the subclass IIb (two-peptide bacteriocins), and (iii) the subclass IIc (other peptide bacteriocins) (Garneau *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006). Most bacteriocins are synthesized as biologically inactive precursors containing an N-terminal extension (the so-called double-glycine-type leader sequence or the Sec-

dependent signal peptide), which is cleaved off concomitantly with secretion of the active bacteriocin (Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003). During the last years, bacteriocins and bacteriocin-producing LAB-strains have been the focus of extensive research due to their potential use as natural biopreservatives for a variety of foods including fermented vegetables and meat, and dairy and fish products (Daeschel and Fleming, 1984; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1999; Cleveland *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2002; Chen and Hoover, 2003; Ringø *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). However, studies on the potential application of LAB-bacteriocins to inhibit microbial spoilage of alcoholic beverages such as wine and beer are scarce, and the most are related to the biopreservative effect of nisin A (NisA) (Ogden and Tubb, 1985; Ogden, 1986; Ogden *et al.*, 1988; Daeschel *et al.*, 1991; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Nauth, 2002; Vaughan *et al.*, 2005). In this respect, NisA has been approved as beer antimicrobial additive only in Australia and New Zealand at levels compliant with good manufacturing practice (Delves-Broughton *et al.*, 1996). Moreover, the antimicrobial activity of the bacteriocinogenic barley isolate *Lactococcus lactis* M30 has been investigated in order to develop microbiologically stable beer (Hartnett *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2004, 2005). The application of bacteriocins in beer, in conjunction with other hurdles, such as pasteurization and filtration, may represent an attractive biopreservation strategy to obtain safer and more stable beers (Vaughan *et al.*, 2004). In general, provided the brewing yeasts are not affected by the bacteriocins, these compounds may be potentially applied at different stages of the brewing process, such as the non-fermented wort (before and/or after boiling), the fermenting wort, and the packaged beer. This strategy would allow to reduce pasteurization regimes which in turn would considerably diminish the energy costs and allow production of beers with an enhanced refreshing taste (Ogden *et al.*, 1988; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 2004, 2005). On the other hand, bacteriocins may be used for washing pitching yeast to eliminate contaminating bacteria as an alternative method to acid washing which is known to affect yeast viability, as well as for cleaning of the brewhouse equipment as a final cleaning rinse (Ogden *et al.*, 1988; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Vaughan *et al.*, 2005). Moreover, recent studies have shown the possibility for future development of wort bioacidifying-LAB and/or yeast starter cultures genetically modified to produce bacteriocins (Schoeman *et al.*, 1999; du Toit and Pretorius, 2000; Dequin, 2001; van Reenen *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2005).

E. faecium L50, a strain isolated from a Spanish dry-fermented sausage (Cintas *et al.*, 1995, 1998b) produces three different bacteriocins (four peptides): (i) EntP is a Sec-dependent pediocin-like bacteriocin (subclass IIa); (ii) EntL50 (EntL50A and EntL50B) is a subclass IIb bacteriocin consisting of two leader-less antimicrobial peptides with a 72% sequence identity, EntL50A and EntL50B; and (iii) EntQ is a subclass IIc leader-less bacteriocin (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d; Criado *et al.*, 2006a). This multiple bacteriocin production confers to *E. faecium* L50 a broad antimicrobial spectrum against: (i) food-borne pathogenic bacteria, such as *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*; (ii) human and animal clinical pathogens, such as *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* and *Streptococcus pneumoniae*; and (iii) several LAB, such as *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., etc. (Cintas *et al.*, 1998b). The genetic determinants of *E. faecium* L50 required for the production

of, and immunity against, EntL50, EntQ and EntP are located on the 50-kb-plasmid pCIZ1, the 7.4-kb-plasmid pCIZ2 and the chromosome from *E. faecium* L50, respectively (Criado *et al.*, 2006a). Moreover, multiple bacteriocin production by *E. faecium* L50 is a temperature-regulated process: EntL50 is produced at 16–42°C but production becomes negligible when growth temperature is above 37°C, whereas EntP and EntQ are synthesized at temperatures from 16 to 47°C (Cintas *et al.*, 2000d; Criado *et al.*, 2006b).

The present work describes the comparative antimicrobial spectrum of six bacteriocinogenic LAB of food origin, including *E. faecium* L50 (EntL50 [EntL50A and EntL50B], EntP and EntQ producer), *E. faecium* T136 (enterocin A [EntA] and enterocin B [EntB] producer), *E. faecium* P13 (EntP producer), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (NisA producer), *Pediococcus acidilactici* 347 (pediocin PA-1 [PedPA-1] producer), and *Lactobacillus sakei* 148 (lactocin S [Las] producer), against 34 beer-spoilage LAB. Moreover, the potential application of bacteriocins from *E. faecium* L50 as beer-biopreservatives at various stages of the brewing process to inhibit the growth of beer-spoilage LAB is investigated.

III.3. MATERIALS AND METHODS

III.3.1. Bacterial strains, brewing substrates and culture conditions

The bacteriocinogenic LAB and the 34 beer-spoilage LAB used in this study are listed in Table III.1. The LAB were grown aerobically in MRS broth (pH 6.2; Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 32°C, except *Lb. lindneri* strains that were propagated in MRS broth (pH 5.2, adjusted with 1M HCl) at 28°C, unless otherwise stated. Wort (hopped and unhopped) and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) commercial lager beers were obtained from the brewing industry Font Salem S. A. (El Puig, Valencia, Spain). Pure EntQ was chemically-synthesized at the Molecular Biology Unit (University of Newcastle Upon Tyne, United Kingdom).

III.3.2. Bacteriocin activity assays

The antimicrobial activity of the bacteriocinogenic cultures was screened by a stab-on-agar test (SOAT) as previously described (Cintas *et al.*, 1995), using 34 beer-spoilage LAB as indicator microorganisms (Table III.1). Briefly, the bacteriocinogenic strains were stabbed onto MRS plates and incubated at 28 or 32°C for 5 h, and then 40 ml of MRS soft (0.8% wt/vol) agar (Oxoid) containing about 1×10^5 CFU/ml the indicator strain (Table III.1) was poured over the plates. After incubation at 28 or 32°C for 24 h, the plates were checked for inhibition zones. The bacteriocinogenic strains were further grown in MRS broth at 32°C as described above, and periodically cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation at $12,000 \times g$ at 4°C for 10 min, pH-adjustment to 6.2 with 1 M NaOH and filter-sterilization through 0.22 µm-pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA). Supernatants were stored at –20°C until use. Bacteriocin activity of supernatants was determined by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.*, 1995) and a microtiter plate assay

Table III.1. Bacteriocinogenic and indicator microorganisms used in this study

Microorganisms	Strain	Origin	Bacteriocin(s) produced ^b	Source or reference ^a
Bacteriocinogenic strains				
<i>Enterococcus faecium</i>	L50	Dry-fermented sausage	EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP and EntQ	Cintas <i>et al.</i> (1995, 1998a, 2000)
	L50/30-2	<i>E. faecium</i> L50 bacteriocin deficient mutant	EntL50 (EntL50A and EntL50B) and EntP	Criado <i>et al.</i> (2006a)
	L50/14-2	<i>E. faecium</i> L50 bacteriocin deficient mutant	EntP	Criado <i>et al.</i> (2006a)
	T136	Dry-fermented sausage	EntA and EntB	Casaus <i>et al.</i> (1997)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	P13	Dry-fermented sausage	EntP	Cintas <i>et al.</i> (1997)
	347	Dry-fermented sausage	PedPA-1	Moreira (1993)
<i>Lactococcus lactis</i>	BB24	Dry-fermented sausage	NisA	Cintas <i>et al.</i> (1998b)
<i>Lactobacillus sakei</i>	148	Dry-fermented sausage	Las	Cintas <i>et al.</i> (1998b)
Indicator strains				
<i>Lactobacillus brevis</i>	216	Beer	ND	CECT
	BB120	Beer	ND	NFBC
	2150	Beer	ND	NFBC
	104	Beer	ND	NFBC
	108	Beer	ND	NFBC
	111	Beer	ND	NFBC
	112	Cider	ND	NFBC
<i>Lactobacillus buchnerii</i>	4674	Beer	ND	CECT
<i>Lactobacillus collinoides</i>	110	Cider	ND	NFBC
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	286T	Malt	ND	CECT
<i>Lb. delbrueckii</i>	4684	Wort	ND	CECT
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	4687	Wort	ND	CECT
<i>Lactobacillus lindneri</i>	20690	Beer	ND	DSMZ
	20691	Beer	ND	DSMZ
	20692	Beer	ND	DSMZ
<i>Lactobacillus mali</i>	4149	Wort	ND	CECT
<i>Lactobacillus sakei</i>	906T	Sake starter	ND	CECT
<i>Lactobacillus</i> sp.	4483	Beer	ND	CECT
	101	Beer	ND	NFBC
<i>Pediococcus damnosus</i>	793T	Lager yeast	ND	CECT
	4679	Beer	ND	CECT
	4680	Beer	ND	CECT
	4692	Beer	ND	CECT
	4693	Ropiness	ND	CECT
	4694	Ropiness	ND	CECT
	4775	Beer	ND	CECT
	4790	Stout	ND	CECT
	4797	Beer	ND	CECT
	113	Stout	ND	NFBC
	114	Stout	ND	NFBC
<i>Pediococcus inopinatus</i>	4777	Beer	ND	CECT
	4784T	Yeast	ND	CECT
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4695T	Yeast	ND	CECT
<i>Pediococcus</i> sp.	2151	Beer	ND	NFBC

^aAbbreviations: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen, GmbH (Braunschweig, Germany); NFBC, National Food Biotechnology Centre (Cork, Ireland). ^bNot determined.

activity was quantified by an MPA. Briefly, each well of the microtiter plate contained 50 µl of two-fold serial dilutions (in MRS) of supernatants, and 150 µl of a diluted (in MRS) fresh overnight culture of the indicator microorganism (*ca.*, 4×10^5 CFU/ml). Growth inhibition was measured spectrophotometrically at 620 nm with a microtiter plate reader (Labsystems iEMS Reader MF, (MPA)

(Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000d), using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. In the ADT, appropriate soft agar media were inoculated with approximately 1×10^5 CFU/ml of the indicator strain and poured onto a Petri dish. After cooling, wells (6-mm diameter) were made in the agar, and 50 μ l of supernatants were added. The plates were kept at 4°C for 2 h, and subsequently incubated at 32°C for 16 h. After incubation, the antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the wells. Subsequently, the bacteriocin Labsystems, Helsinki, Finland) after incubation at 32°C for 16 h. One bacteriocin unit (BU) was defined as the highest dilution of the supernatant causing 50% growth inhibition (50% of the turbidity of the control culture without bacteriocin) (section II.3.4.9.1.). Subsequently, the supernatants from each bacteriocinogenic strain showing the highest antimicrobial activity were challenged by an ADT and an MPA against the indicator microorganisms listed in Table III.1. Additionally, 20-fold concentrated supernatants (CS) were obtained by lyophilization. The lyophilized samples were dissolved to 1/20 of its original volume in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0), and stored at -20°C until further use.

The antimicrobial activity of supernatants from *E. faecium* L50 and its derived bacteriocin deficient-mutants, *E. faecium* L50/30-2 (pCIZ1+, pCIZ2-; EntL50A, EntL50B, and EntP producer) and *E. faecium* L50/14-2 (pCIZ1-, pCIZ2-; EntP producer) (Criado *et al.*, 2006a), grown at 32 and 42°C for 14–18 h, was assayed by a spot-on-agar test (SPAT) (Cintas *et al.*, 1998a) by spotting 5 μ l of supernatants onto MRS agar (1.5% wt/vol) plates previously seeded with, approximately, 1×10^5 CFU/ml of a fresh overnight culture of the indicator microorganisms listed in Table III.4. Spotted plates were incubated at 32°C for 16–18 h, and the antimicrobial activity was quantified by measuring the diameter (mm) of the inhibition zones around the spots. The antimicrobial activity of chemically-synthesized EntQ, as well as *in vitro*-synthesized EntL50A and EntL50B, separately and together (EntL50AB), were evaluated by a SPAT against the indicator microorganisms listed in Tables III.4 and III.5, respectively. To measure synergistic activities, *in vitro*-synthesized EntL50A and EntL50B were challenged, separately and combined in a 1:1 ratio, in an MPA against the same indicator microorganisms. All the aforementioned challenge tests were performed in duplicate.

III.3.3. Generation of bacteriocin resistant mutants of the beer-spoilage strain *P. damnosus* CECT4797

In order to evaluate the ability of *P. damnosus* CECT4797 to develop resistances to NisA, PedPA-1 and the enterocins from *E. faecium* L50, aliquots of CS from *Lc. lactis* BB24 (9,200 BU/ml), *P. acidilactici* 347 (540 BU/ml) and *E. faecium* L50 (275 BU/ml) were added to fresh cultures of *P. damnosus* CECT4797 (*ca.*, initial population of 1×10^5 CFU/ml) in MRS broth. Cultures were incubated at 32°C for 16–18 h. After incubation, the survivors were challenged against the same bacteriocin concentrations by the ADT and the MPA described above, and aliquots of the cultures were subsequently transferred to fresh MRS broth (*ca.*, initial population of 1×10^5 CFU/ml) and exposed again to the same bacteriocin concentrations for a further growth cycle of 16–18 h. This process was repeated until resistant mutants or mutants displaying an increase in resistance were obtained. A similar

procedure as that described above but without the respective bacteriocin was performed for a total of five passages to estimate the stability of the bacteriocin resistance phenotypes.

III.3.4. *In vitro* transcription/translation of enterocin L50A (*entL50A*) and enterocin L50B (*entL50B*) structural genes separately and together

EntL50A and EntL50B were synthesized *in vitro*, separately and together, by using the *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). The recombinant plasmids pRSETB-*entL50A*, pRSETB-*entL50B* and pRSETB-*entL50AB* (Cintas *et al.*, 1998a) were used as DNA template for the *in vitro* synthesis of EntL50A, EntL50B and EntL50AB, respectively. The coupled *in vitro* transcription/translation reactions were carried out at 37°C for 2 h. A transcription/translation reaction using the wild-type plasmid pRSETB as DNA template was set up as a control.

III.3.5. PCR detection of potential virulence factors

Detection of genes encoding potential virulence factors in *E. faecium* L50 was performed by PCR. The following primer pairs were used: TE3/TE4 for detection of *agg* (encoding the aggregation substance), TE9/TE10 for *gelE* (gelatinase), CYLL_L-R1/CYLL_S-RS for *cylL_L-cylL_S* (cytolysin precursor), TE13/TE14 for *cylM* (posttranslational modification of cytolysin), TE15/TE16 for *cylB* (transport of cytolysin), TE17/TE18 for *cylA* (activation of cytolysin), TE34/TE36 for *esp* (enterococcal surface protein), TE5/TE6 for *efaA_{fs}* (cell wall adhesins of *Enterococcus faecalis*), TE37/TE38 for *efaA_{fm}* (cell wall adhesins of *E. faecium*), TE51/TE52 for *cpd* (sex pheromones), TE49/TE50 for *cob* (sex pheromones), and TE53/TE54 for *ccf* (sex pheromones) (Gilmore *et al.*, 1994; Eaton and Gasson, 2001). Oligonucleotide primers were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). *E. faecalis* P4 was used as a positive control for amplification of *agg*, *E. faecalis* OG1s for *gelE*, *E. faecalis* P36 for *esp*, *E. faecalis* EBH1 for *efaA_{fs}*, *E. faecium* F10 for *efaA_{fm}*, and *E. faecalis* F2 for *cpd*, *cob* and *ccf*. PCR-amplifications were performed from total bacterial DNA obtained using the Wizard DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, Wis.) in 50 µl reaction mixtures with 1–3 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer and 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97 °C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94 °C for 45 sec), annealing (48 to 64 °C for 30 sec) and elongation (72 °C for 20 to 105 sec), ending with a final extension step at 72 °C for 7 min in a Techgene DNA thermal cycler (Techne, Cambridge, United Kingdom). PCR resulting products were analyzed by electrophoresis on 2% (wt/vol) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad Laboratories S. A., Madrid, Spain).

III.3.6. Gelatinase and hemolysin production, and antibiotic susceptibility testing

For gelatinase production, single colonies of *E. faecium* L50 previously grown on MRS agar (1.5% wt/vol) (Oxoid) were streaked onto Todd-Hewitt agar (1.5% wt/vol) (Oxoid) containing 30 g of gelatin (Oxoid) per liter, grown overnight at 37°C, and placed at 4°C for 5 h before examination for zones of turbidity around the colonies indicating hydrolysis.

In order to investigate hemolysin production, strains streaked onto layered fresh horse blood (5% vol/vol) (Oxoid) on Columbia agar base (1.5% wt/vol) (Oxoid) were grown at 37°C for 24–48 h. Hemolysis was revealed by the formation of clear zones surrounding the colonies on blood agar plates.

Antimicrobial susceptibility patterns were determined by overlaying antibiotic-containing disks (Oxoid) on Diagnostic Sensitivity Test (Oxoid) agar previously seeded with approximately 1×10^5 CFU/ml of *E. faecium* L50. The antibiotics tested were ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), fusidic acid (10 µg), gentamycin (10 and 120 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), penicillin G (10 IU), rifampicin (5 µg), streptomycin (10 µg), teicoplanin (30 µg), tetracycline (30 µg), and vancomycin (30 µg). Inhibition zone diameters were measured after overnight incubation of the plates at 37°C. Resistance phenotypes were recorded as recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002).

III.3.7. Growth, survival and production of *Enterococcus faecium* L50 bacteriocins in wort (hopped and unhopped) and alcoholic and non-alcoholic lager beers

To investigate whether *E. faecium* L50 could grow or survive, and produce bacteriocins in boiled wort (hopped and unhopped), alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers, and unhopped wort supplemented with different concentrations of MRS broth (12.5, 25 and 50%, vol/vol), these substrates were filter-sterilized and subsequently inoculated with *E. faecium* L50 to viable counts of approximately 1×10^7 CFU/ml and incubated at 32°C for 6 days. A culture of *E. faecium* L50 grown in MRS broth under the same conditions was set up as a control. Periodically, samples were aseptically withdrawn from the cultures for bacterial viable counting on MRS agar and determination of the antimicrobial activity of the corresponding supernatants by the ADT and the MPA described above using *P. damnosus* CECT4797 (EntL50 and EntP sensitive, and EntQ resistant; EntL50^s-EntP^s-EntQ^r), *Lb. brevis* NFBC108 (EntL50 sensitive, and EntP and EntQ resistant; EntL50^s-EntP^r-EntQ^r), and *E. faecium* P13 (EntL50 and EntQ sensitive, and EntP resistant; EntL50^s-EntP^r-EntQ^s). All these experiments were performed in duplicate.

III.3.8. Effect of *Enterococcus faecium* L50 bacteriocins on the viability of beer-spoilage LAB in MRS broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers

To determine the effect of enterocins from *E. faecium* L50 on the viability of the beer-spoilage LAB *Lb. brevis* NFBC108, *Lb. lindneri* DSMZ20690 and *P. damnosus* CECT4797 in MRS broth, aliquots of the CS from *E. faecium* L50 grown at 32°C containing different bacteriocin concentrations (136–3,400 BU/ml) were added to fresh cultures of these strains (*ca.*, initial population of 2×10^3 and 5×10^5 CFU/ml) in MRS broth, which were further incubated at 28 or 32°C for 15 days. A 20-fold-concentrated MRS broth was set up as a control. The bactericidal effect of the CS was determined periodically by viable bacterial counting on MRS agar. Moreover, in order to evaluate their sensitivity/resistance phenotypes, survivors were grown in MRS broth as described above and challenged against the CS by an MPA as described above. The parental strains were set up as a control. A similar procedure was used to determine the antimicrobial effect of enterocins from *E. faecium* L50 against the beer-spoilage *Lb. brevis* NFBC108 in hopped and unhopped wort, and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) commercial lager beers, except that the indicator microorganism was inoculated at an initial population of $4\text{--}5 \times 10^5$ CFU/ml, challenged against different bacteriocin concentrations (1,636–6,545 BU/ml) and the cultures incubated at 32°C for 6–15 days. All these challenge tests and appropriate controls were performed in duplicate.

III.3.9. Enterocin L50 (L50A and L50B) stability during the brewing process and storage

The effect of mashing, wort boiling, fermentation and pasteurization on the biological activity of EntL50 (EntL50A and EntL50B) was determined. For these studies, aliquots of CS from *E. faecium* L50 were diluted (1/20) in wort (hopped and unhopped) or lager beer (5% ethanol, vol/vol), and subjected to the heat treatments commonly used in the brewing industries for mashing (consecutive heating at 45, 62, 72 and 78°C for 30 min, in unhopped wort), wort boiling (100°C for 90 min, in hopped wort), fermentation (15°C for 6–10 days, in hopped wort), and pasteurization (65°C for 40 min and 75°C for 10 min, in lager beer). After heat treatments, samples were rapidly cooled in ice, and then stored at –20°C until further use. Untreated aliquots of samples were also stored at –20°C until use as a control was required. The antimicrobial activity of samples and controls was determined in duplicate by the ADT described above using *Lb. brevis* NFBC108 as indicator microorganism.

The effect of long-term storage on EntL50 (EntL50A and EntL50B) stability was also tested. For this purpose, aliquots of CS from *E. faecium* L50 diluted (1/20) in alcoholic (5% ethanol, vol/vol) lager beer were stored at 8 and 25°C for 30 days. An aliquot of untreated sample was stored at –20°C until use as a control was required. Periodically, the antimicrobial activity of the samples and controls was determined in duplicate by the ADT described above using *Lb. brevis* NFBC108 as indicator microorganism.

III.4. RESULTS

III.4.1. Comparative antimicrobial activity of six bacteriocinogenic LAB against beer-spoilage LAB and development of bacteriocin resistant mutants

The direct antimicrobial activity of six bacteriocinogenic LAB strains and the bacteriocin activity of the corresponding supernatants against 34 beer-spoilage LAB were determined under standardized conditions by a SOAT (results not shown), as well as by an ADT and an MPA (Table III.2), respectively. Cultures and supernatants from *E. faecium* L50 (EntL50 [EntL50A and EntL50B], EntP and EntQ producer), *Lc. lactis* BB24 (NisA producer), *Lb. sakei* 148 (Las producer) and, to a lesser extent, *P. acidilactici* 347 (PedPA-1 producer) displayed a broad antimicrobial spectrum against most of the indicator microorganisms, including the relevant beer spoiling species *Lb. brevis*, *Lb. lindneri* and *P. damnosus*. However, *E. faecium* P13 (EntP producer) and *E. faecium* T136 (EntA and EntB producer) supernatants showed a similar narrow spectrum, only inhibiting six and seven beer-spoilage LAB, respectively. Remarkably, the NisA-producer strain strongly inhibited the growth of all tested beer-spoilage LAB, and the multiple enterocin producer *E. faecium* L50, the Las producer *Lb. sakei* 148 and the PedPA-1 producer *P. acidilactici* 347 were shown to be active against 26, 24 and 21 out of the targeted 34 beer-spoilage LAB, respectively. Interestingly, spontaneously generated resistant colonies were not obtained for any of the tested indicator microorganism when challenged against the amount of bacteriocins typically present in supernatants from *Lc. lactis* BB24 (165,700 BU/ml), *P.*

Table III.2. Antimicrobial activity of bacteriocinogenic LAB against beer-spoilage LAB

		Bacteriocinogenic strains											
		<i>E. faecium</i>				<i>P. acidilactici</i>				<i>Lc. lactis</i>		<i>Lb. sakei</i>	
		L50		T136		347		BB24		148			
Indicator species	Strain	ADT ^a	MPA ^b	ADT	MPA	ADT	MPA	ADT	MPA	ADT	MPA	ADT	MPA
<i>Lb. brevis</i>	216	16.2 n2	2,600	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	19.3 n2	5,400	15.6 D	1,300
	BB120	13.3 D	300	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	18.1 D	5,100	11.6 D	200
	2150	9.7 n+	30	NIZD	NID	NIZD	NID	12.0 n2	NID	18.2 n2	3,700	7.7 D	30
	104	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	9.1 n+	300	NIZD	NID
	108	17.0 n2	6,100	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	24.0 n+	19,500	17.9 n+	3,500
	111	11.2 n+	80	NIZD	NID	NIZD	NID	13.0 n2	NID	18.9 n2	2,800	7.7 n2	30
<i>Lb. buchnerii</i>	112	6.4 n+	70	NIZD	NID	NIZD	NID	13.0 n2	500	17.1 n2	2,200	7.2 n2	30
	4674	18.4 n2	2,800	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	33.6 n2	274,000	17.1 n2	2,300
	110	10.5 n2	70	NIZD	NID	NIZD	NID	13.6 n2	NID	17.3 n2	7,800	8.3 n2	NID
<i>Lb. collinoides</i>	286	21.0 n+	6,400	NIZD	NID	7.9 n+	NID	NIZD	NID	30.1 n+	22,000	19.8 n+	5,600
<i>Lb. delbrueckii</i>	4684	15.3 n+	2,100	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	21.0 n+	12,800	11.3 n+	1,100
	4687	14.3 n2	100	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	18.3 n2	11,600	14.5 n2	90
<i>Lb. lactis</i>	20690	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	21.5 n+	1,000	NIZD	NID
<i>Lb. lindneri</i>	20691	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	19.2 n+	200	NIZD	NID
	20692	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	25.1 n+	400	NIZD	NID
	4149	17.4 n2	18,800	11.1 n+	2,000	NIZD	NID	16.0 n2	44,800	21.6 n2	3,100	17.2 n2	7,500
<i>Lb. mali</i>	906	17.3 n2	1,300	22.0 n2	5,100	15.3 n2	700	22.8 n2	16,700	24.0 n2	179,800	16.0 n2	50
<i>Lactobacillus</i> sp.	4483	20.4 n2	2,000	23.6 n2	5,400	18.1 n2	1,600	24.3 n2	17,000	23.2 n2	214,400	17.6 n2	600
	101	13.1 n+	300	NIZD	NID	NIZD	NID	9.3 n+	80	23.1 n+	4,100	13.9 n+	150
<i>P. damnosus</i>	793	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	19.6 n2	9,900	NIZD	NID
	4679	8.9 n2	60	NIZD	NID	NIZD	NID	11.3 n2	200	14.3 n2	1,200	6.8 n+	40
	4680	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	25.6 n2	2,600	NIZD	NID
	4692	NIZD	200	NIZD	NID	NIZD	NID	11.3 n+	3,600	31.9 n2	5,000	NIZD	100
	4693	18.2 n2	20,500	9.3 n+	800	7.0 n-	100	18.4 n2	2,200	29.4 n2	69,300	20.9 n2	18,300
	4694	19.5 n2	22,600	14.1 n+	12,900	8.2 n-	600	20.4 n2	101,300	22.4 n+	141,200	17.9 n2	5,000
	4775	10.1 n2	100	NIZD	NID	NIZD	NID	11.7 n2	400	17.4 n2	4,400	8.8 n2	60
	4790	9.2 n+	80	NIZD	NID	NIZD	NID	12.6 n2	400	16.9 n+	6,700	8.5 n+	30
	4797	15.5 n2	5,900	19.1 n+	2,600	10.8 n+	1,900	20.5 n+	10,600	22.6 n+	165,700	14.0 n+	900
	113	8.2 n+	50	NIZD	NID	NIZD	NID	11.6 n2	NID	17.1 n2	2,500	7.6 n+	NID
<i>P. inopinatus</i>	114	7.1 n+	30	NIZD	NID	NIZD	NID	13.4 n2	NID	16.6 n2	2,100	NIZD	NID
	4777	14.7 n2	1,600	12.9 n+	2,500	NIZD	NID	18.6 n2	3,300	16.8 n2	1,600	13.1 n2	800
	4784	NIZD	NID	NIZD	NID	NIZD	NID	14.9 n2	2,000	13.4 n2	600	NIZD	NID
<i>P. pentosaceus</i>	4695	8.4 n-	60	NIZD	NID	NIZD	NID	10.4 n2	NID	13.5 n2	1,300	6.9 n+	40
<i>Pediococcus</i> sp.	2151	7.2 n-	50	NIZD	NID	NIZD	NID	13.8 n2	NID	17.5 n2	4,100	NIZD	30

^aAntimicrobial activity (mm) as determined by an ADT. Inhibition zones are differentiated as follows: D= diffuse, n-= slightly nitide-, n= nitide, n+= very nitide and n2= extremely nitide. NIZD, no inhibition zone detected using 50 µl of supernatant.

^bAntimicrobial activity (BU/ml) as determined by an MPA. NID, no inhibition detected using 100 µl of supernatant.

acidilactici 347 (10,600 BU/ml), *E. faecium* L50 (5,900 BU/ml), *Lb. sakei* 148 (900 BU/ml), *E. faecium* T136 (2,600 BU/ml) and *E. faecium* P13 (1,900 BU/ml).

The strain *P. damnosus* CECT4797 was selected to further evaluate the generation of mutants resistant to PedPA-1, NisA and enterocins from *E. faecium* L50 by successive exposures to these bacteriocins at sublethal concentrations (*ca.*, 5% of the original value in the supernatants). As shown in Fig. 3.1 and Table III.3, PedPA-1 fully resistant mutants were obtained after 4 successive growth cycles of *P. damnosus* CECT4797 in MRS broth containing supernatant from *P. acidilactici* 347 (540 BU/ml). However, 13 and 20 passages of *P. damnosus* CECT4797 in the presence of supernatants from *Lc. lactis* BB24 (9,200 BU/ml) and *E. faecium* L50 (275 BU/ml), respectively, were needed to generate mutants not displaying full bacteriocin resistance but showing a significant increase in resistance to NisA (2,750-fold increase) and enterocins from *E. faecium* L50 (300-fold increase), respectively.

Interestingly, mutants resistant to PedPA-1, NisA and enterocins from *E. faecium* L50 showed an increased cross-resistance to NisA and enterocins from *E. faecium* L50 (50- and 120-fold increase, respectively), PedPA-1 and enterocins from *E. faecium* L50 (55- and 400-fold increase, respectively), and PedPA-1 and NisA (40- and 2,750-fold increase, respectively), respectively (Fig. 3.1; Table III.3). It is worth noting that all generated mutants were found to retain their bacteriocin resistance phenotype for at least five passages in MRS broth in the absence of the respective bacteriocin, and long-term stability of the resistance phenotypes was confirmed routinely.

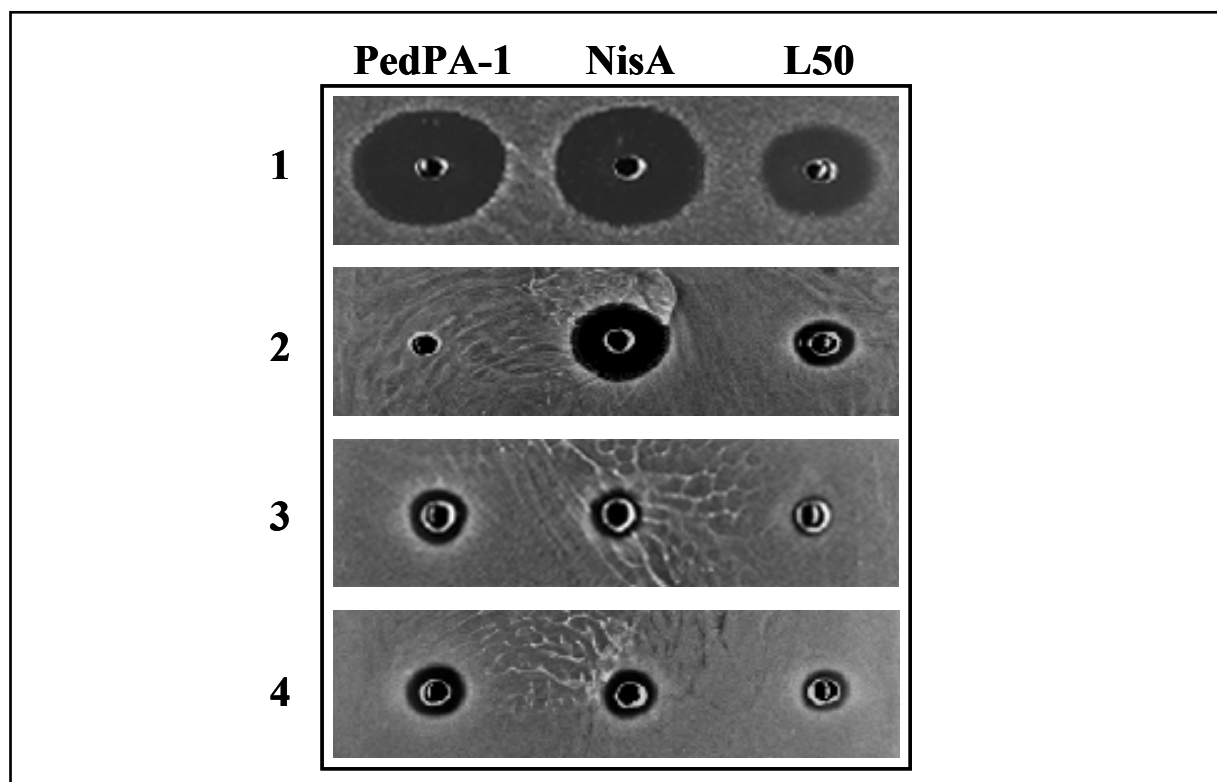


Figure 3.1. Bacteriocin cross-sensitivity of the wild-type strain *P. damnosus* CECT4797 (EntL50^s–EntP^s–EntQ^r, NisA^s, PedPA-1^s) (1) and its derived PedPA-1-resistant (2), NisA-resistant (3), and *E. faecium* L50 bacteriocins-resistant (4) mutants to PedPA-1, NisA and *E. faecium* L50 bacteriocins as determined by an ADT.

Table III.3. Bacteriocin cross-sensitivity of the wild-type strain *P. damnosus* CECT4797 (EntL50^s–EntP^s–EntQ^r, NisA^s, PedPA-1^s) and its derived PedPA-1-resistant, NisA-resistant, and *E. faecium* L50 bacteriocins-resistant mutants

<i>P. damnosus</i> strains	Bacteriocin sensitivity (BU/ml) ^a			Description ^b
	PedPA-1	NisA	L50	
CECT4797	11,200	165,000	6,000	Wild type strain
4797-R-PedPA-1 ^c	0	3,300	50	PedPA-1-resistant mutant
4797-R-NisA ^d	210	60	15	NisA-resistant mutant
4797-R-L50 ^e	270	60	20	L50-resistant mutant

^aSensitivity (BU/ml) to supernatants containing pediocin PA-1 (PedPA-1), nisin A (NisA) or *E. faecium* bacteriocins (L50) as determined by an MPA.

^bResistant mutants were isolated after 4 (c), 13 (d) or 20(e) sequential passages in MRS broth containing PedPA-1, NisA or L50, respectively.

III.4.2. Identification of *Enterococcus faecium* L50 bacteriocins with antimicrobial activity against beer-spoilage LAB

The broad spectrum multiple bacteriocin producer *E. faecium* L50 was selected for further evaluation of its enterocins as beer-biopreservatives at various stages of the brewing process. First, in order to identify the bacteriocin(s) responsible for the antimicrobial activity of this strain against the beer-spoilage LAB, the extracellular antimicrobial activity of *E. faecium* L50 (EntL50, EntP and EntQ producer at 32°C; EntP and EntQ producer at 42°C), its derived bacteriocin-deficient mutants *E. faecium* L50/30–2 (EntL50 and EntP producer at 32°C; EntP producer at 42°C) and *E. faecium* L50/14–2 (EntP producer at 32 and 42°C) (Criado *et al.*, 2006b) grown at 32 and 42°C, and chemically-synthesized EntQ was determined by a SPAT against seven beer-spoilage LAB. The results presented in Table III.4 show that: (i) chemically-synthesized EntQ did not inhibit the growth of any of the tested indicator strains, but its presence in the supernatants resulted in a significant increase in their antimicrobial activity, (ii) EntP showed a narrow antimicrobial spectrum, only including two *P. damnosus* strains, and (iii) EntL50 (EntL50A and EntL50B) showed a strong inhibitory activity against the seven beer-spoilage LAB evaluated. These results indicated that the broad antimicrobial spectrum against beer-spoilage LAB exerted by the multiple bacteriocin producer *E. faecium* L50 is mainly due to the production of EntL50 (EntL50A and EntL50B).

Table III.4. Antimicrobial activity of *E. faecium* L50 and its bacteriocin-deficient mutants *E. faecium* L50/30-2, and *E. faecium* L50/14-2 grown at 32°C and 42°C in MRS broth, and chemically-synthesized EntQ against selected indicator microorganisms^a

		32°C			42°C			EntQ ^c
		<i>E. faecium</i> ^b			<i>E. faecium</i>			
Indicator species	Strain	L50	L50/30-2	L50/14-2	L50	L50/30-2	L50/14-2	
		(L50, P and Q)	(L50 and P)	(P)	(P and Q)	(P)	(P)	
<i>Lb. brevis</i>	108	17.0 n2	9.1 n2	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD
<i>Lb. buchnerii</i>	4674	18.4 n2	9.6 n2	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD
<i>Lb. mali</i>	4149	17.4 n2	12.6 n2	NIZD	7.2 D	6.7 D	NIZD	NIZD
<i>P. damnosus</i>	4693	18.2 n2	12.4 n2	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD
	4694	19.5 n2	13.5 n2	7.8 n-	6.8 D	6.7 D	4.9 D	NIZD
	4797	15.5 n2	13.1 n2	10.5 n2	11.0 n2	10.3 n2	10.3 n2	NIZD
<i>P. inopinatus</i>	4777	14.7 n2	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD	NIZD

^aAntimicrobial activity (mm) of supernatants and chemically-synthesized EntQ as determined by a SPAT. Symbols as in Table III.2. NIZD no inhibition zone detected using 5 µl of supernatant.

^bThe bacteriocin(s) produced by each strain are in parentheses. EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP and EntQ are abbreviated as L50, P and Q, respectively.

^cChemically-synthesized EntQ.

Second, in order to elucidate if EntL50A and EntL50B possess antimicrobial activity on their own, both peptides were synthesized *in vitro*, separately and together, and their antimicrobial activity tested by a SPAT against seven beer-spoilage LAB (results using *P. damnosus* CECT4797 are shown in Fig. 3.2 as an example). Interestingly, *in vitro* synthesized EntL50A and EntL50B displayed antimicrobial activity by themselves, but *in vitro* synthesized EntL50AB exhibited a stronger antimicrobial activity against all tested indicator strains. These results suggested that the two peptides together possess a greater antimicrobial effect than that exerted by both peptides acting alone.

To confirm and quantify this synergistic effect, an MPA was used to determine the bacteriocin activity of samples containing either *in vitro* synthesized EntL50A, EntL50B or a mixture of both peptides. The results presented in Table III.5 show that when the two peptides were mixed in a 1:1 ratio, their antimicrobial effect was much greater than the additive effect of the two peptides acting independently. Furthermore, the degree of synergism varies (1.1 to 5.1 times) depending on the microorganism used as indicator.

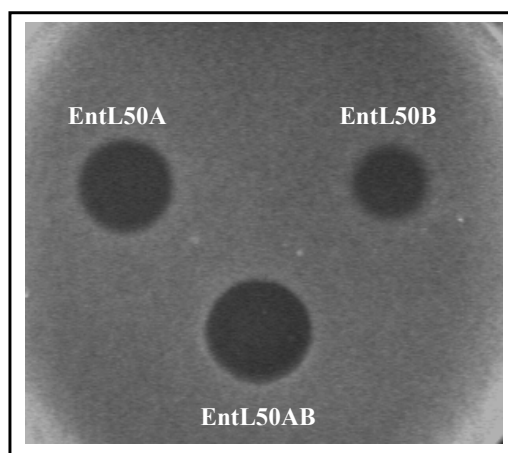


Figure 3.2. Antimicrobial activity of *in vitro*-synthesized EntL50A and EntL50B, and *in vitro*-cosynthesized EntL50A and EntL50B (EntL50AB) against *P. damnosus* CECT4797 as determined by a SPAT.

Table III.5. Antimicrobial activity and synergistic antimicrobial activity of *in vitro*-synthesized EntL50A and EntL50B

Indicator species	Strain	Antimicrobial activity (BU/ml) ^a			Synergism coefficient
		EntL50A	EntL50B	EntL50A+EntL50B	
<i>Lb. brevis</i>	108	18,400	16,100	46,500	1.3
<i>Lb. buchnerii</i>	4674	109,700	286,700	819,200	2.1
<i>Lb. mali</i>	4149	803,400	53,900	4,396,600	5.1
<i>P. damnosus</i>	4693	27,300	24,400	112,200	2.2
	4694	213,500	573,400	1,638,400	2.1
	4797	94,000	34,600	363,300	2.8
<i>P. inopinatus</i>	4777	171,200	24,100	207,700	1.1

^aAntimicrobial activity (BU/ml) as determined by an MPA. For synergism assays, samples of separately *in vitro*-synthesized EntL50A and EntL50B were mixed in a ratio 1:1 (EntL50A+EntL50B).

III.4.3. Safety aspects of *Enterococcus faecium* L50

The potential safety of *E. faecium* L50 was evaluated by: (i) PCR-detection of genes encoding potential virulence factors, (ii) analysis of hemolysin and gelatinase production, and (iii) antibiotic susceptibility testing. *E. faecium* L50 amplified a 735-bp fragment coding for the cell wall adhesin (*efaA_{fm}*), and a 543-bp fragment of the sex pheromone gene *ccf*. This strain was phenotypically hemolysin (Hly) and gelatinase (GelE) negative. Phenotypes recorded from the antimicrobial susceptibility patterns of *E. faecium* L50 against antibiotic-containing disks (results not shown) indicated that this strain was resistant to clindamycin, nalidixic acid and streptomycin, showed moderate susceptibility to erythromycin and kanamycin, and resulted sensitive to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, fusidic acid, gentamycin (10 and 120 µg), nitrofurantoin, norfloxacin, penicillin G, rifampicin, teicoplanin, tetracycline and vancomycin.

III.4.4. Growth, survival and production of *Enterococcus faecium* L50 bacteriocins in wort (hopped and unhopped) and lager beers

E. faecium L50 was inoculated (1×10^7 CFU/ml) in wort (hopped and unhopped), and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0%, vol/vol) lager beers, incubated at 32°C for 6 days and sampled periodically for viable bacterial counting and bacteriocin activity quantification as described above. *E. faecium* L50 did not grow neither in hopped wort nor in alcoholic and non-alcoholic lager beers, and only survived in these substrates for 72 h (1×10^1 CFU/ml), 48 h (4×10^2 CFU/ml), 72 h (4×10^1 CFU/ml) and 72 h (4×10^1 CFU/ml), respectively (results not shown). Although *E. faecium* L50 did not grow in unhopped wort, this strain survived for 6 days (2.5×10^5 CFU/ml) (Fig. 3.3). In control cultures grown in MRS broth, *E. faecium* L50 counts increased from 1×10^7 to 1.5×10^9 CFU/ml at 12 h, and 5×10^7 CFU/ml were obtained after incubation for 6 days (Fig. 3.3). By using an ADT and an MPA, with *P. damnosus* CECT4797 (EntL50^s-EntP^s-EntQ^r), *Lb. brevis* NFBC108 (EntL50^s-EntP^r-EntQ^r), and *E. faecium* P13 (EntL50^s-EntP^r-EntQ^s) as indicator microorganisms, it was shown that *E. faecium* L50 did not produce any detectable EntL50, EntP or EntQ activity in the supernatant when grown in the substrates cited above. To further investigate whether *E. faecium* L50 could grow or survive, and produce bacteriocins in a modified unhopped wort, this substrate was supplemented with different concentrations of MRS broth (12.5, 25 and 50%, vol/vol). Strikingly, in all these fortified unhopped worts, *E. faecium* L50 viable counts rapidly decreased from an initial value of approximately 1×10^7 CFU/ml to 2.7×10^3 CFU/ml (24 h), 1.2×10^5 CFU/ml (12 h), and 9.2×10^5 CFU/ml (6 h). Subsequently, viable counts increased stepwise to 1×10^9 CFU/ml at 72, 48 and 36 h, respectively, and approximately 1×10^8 CFU/ml were obtained after incubation for 6 days (Fig. 3.3). *E. faecium* L50 was only able to produce bacteriocin(s), at least EntL50, in unhopped wort supplemented with 50% MRS broth, being the maximum antimicrobial activity similar to that found in MRS broth, but the production kinetics slightly slower.

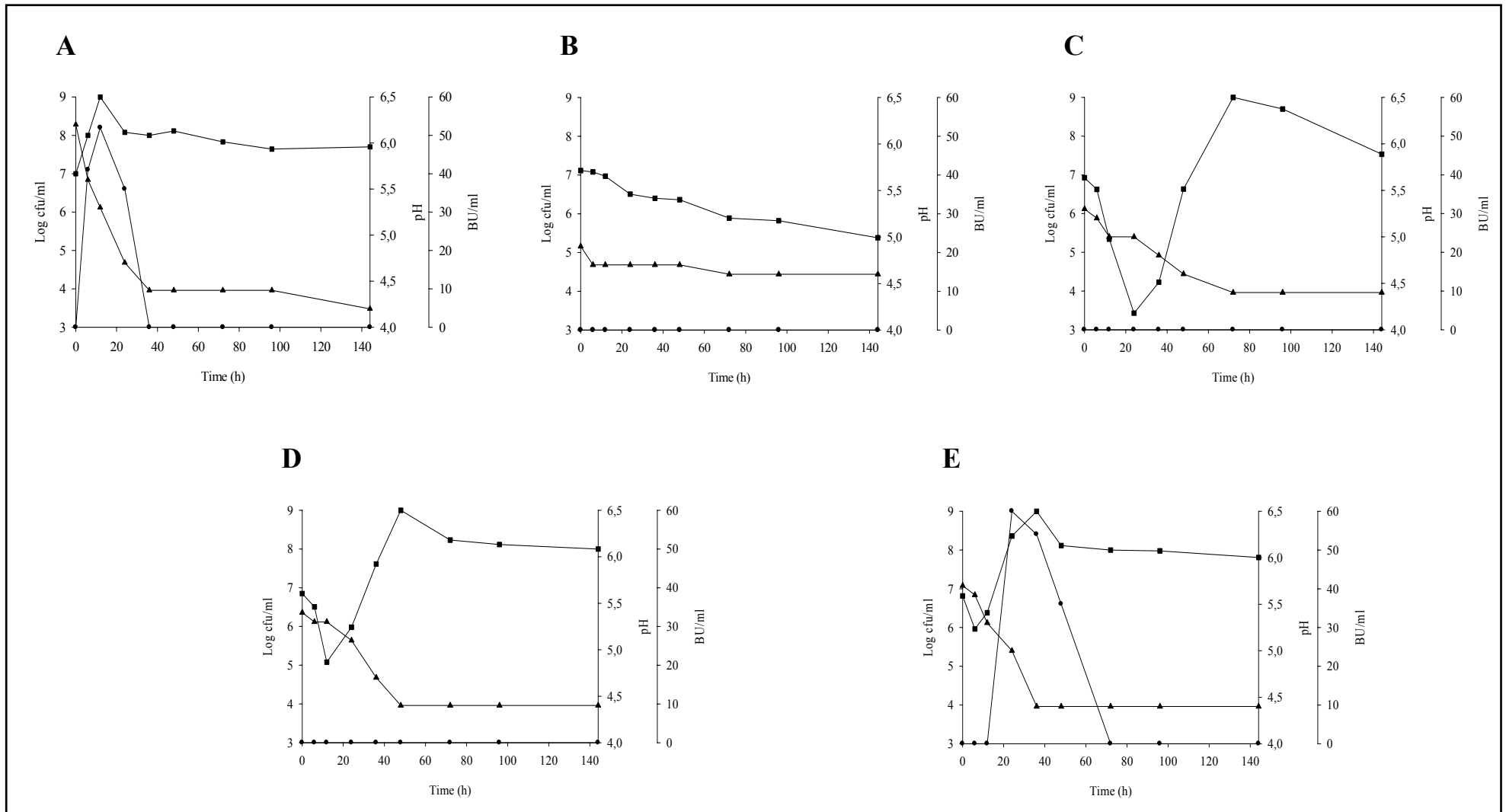


Figure 3.3. Growth (■), acidification (▲) and antimicrobial activity (●) of *E. faecium* L50 in MRS broth (A), unhopped wort (B), and unhopped wort supplemented with 12.5 (C), 25 (D) and 50% (wt/vol) (E) of MRS broth at 32°C. The antimicrobial activity was determined by an MPA using *Lb. brevis* NFBC108 (EntL50^s–EntP^r–EntQ^f) as indicator microorganism.

III.4.5. Bactericidal effect of *Enterococcus faecium* L50 bacteriocins against beer-spoilage LAB in MRS broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers

For these studies, CS from *E. faecium* L50 with known bacteriocin concentrations against *Lb. brevis* NFBC108 (327,288 BU/ml), *P. damnosus* CECT4797 (272,024 BU/ml) and *Lb. lindneri* DSMZ20690 (strain not sensitive to the enterocins from *E. faecium* L50 by ADT, as shown in Table III.2) were challenged against these beer-spoilage microorganisms grown in MRS broth and several brewing substrates at 28 or 32°C.

First, the bactericidal effect of *E. faecium* L50 bacteriocins against *Lb. brevis* NFBC108, *P. damnosus* CECT4797 and *Lb. lindneri* DSMZ20690 in MRS broth was studied. The addition of 1,636 and 818 BU/ml of CS from *E. faecium* L50 to a culture of *Lb. brevis* NFBC108 (initial population of 5×10^5 CFU/ml) resulted in a rapid and drastic decrease in viable counts down to 1×10^2 and 4×10^2 CFU/ml, respectively, after incubation for 2 h, representing a decrease of the initial population of 99.98 and 99.92%, respectively (Fig. 3.4.A). Interestingly, no viable counts were obtained neither at 6 h of treatment nor after incubation for 15 days. The addition of 491 BU/ml of CS also resulted in a rapid decrease in viable counts, although the bactericidal effect was much slower. In this respect, 1×10^3 and 2×10^1 CFU/ml viable counts were obtained at 2 and 12 h of incubation, respectively, representing a decrease of the initial population of 99.8 and 99.99%, respectively (Fig. 3.4.A). At this point, the

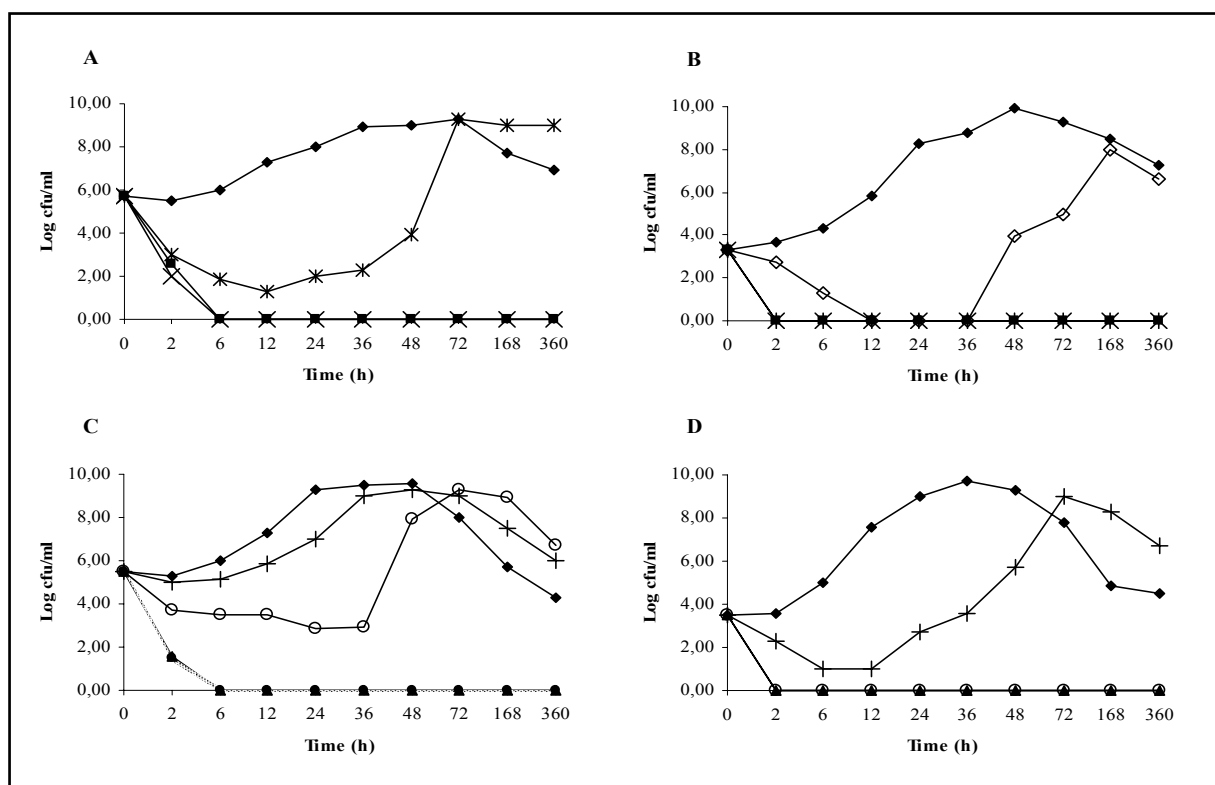


Figure 3.4. Effect of *E. faecium* L50 bacteriocins on *Lb. brevis* NFBC108 (5×10^5 CFU/ml [A] and 2×10^3 CFU/ml [B]), and *P. damnosus* CECT4797 (3×10^5 CFU/ml [C] and 3×10^3 CFU/ml [D]) grown in MRS broth at 32°C. The CS was added at the following concentrations: 136 (+), 164 (◇), 491 (*), 680 (○), 818 (■), 1,360 (▲), 1,636 (×), and 3,400 BU/ml (●). The effect of the addition of 20-fold-concentrated MRS medium is shown as a control (◇).

viable counts began to increase and reached 2×10^9 CFU/ml after treatment for 72 h. The addition of 818 and 491 BU/ml of CS to a culture of *Lb. brevis* NFBC108 (initial population of 2×10^3 CFU/ml) resulted in a more rapid and drastic decrease in viable counts (Fig. 3.4.B), since no viable counts were obtained neither at 2 h of treatment nor after incubation for 15 days. The addition of 164 BU/ml of CS also resulted in a rapid decrease in viable counts, although the bactericidal effect was much slower. In this respect, 5×10^2 and 2×10^1 CFU/ml viable counts were obtained at 2 and 6 h of incubation, representing a decrease of the initial population of 75 and 99%, respectively, and no viable counts were obtained between 12 and 36 h of treatment. At this point, the viable counts began to increase and reached 1×10^8 CFU/ml after treatment for 7 days. In the control assays, *Lb. brevis* NFBC108 grew to 2×10^9 and 8×10^9 CFU/ml at 72 and 48 h of incubation, respectively, and 8×10^6 and 2×10^7 CFU/ml viable counts were obtained, respectively, after incubation for 15 days (Figs. 3.4.A and 3.4.B). On the other hand, the addition of 3,400 and 1,360 BU/ml of CS from *E. faecium* L50 to a culture of *P. damnosus* CECT4797 (initial population of 3×10^5 CFU/ml) resulted in a rapid and drastic decrease in viable counts down to 3×10^1 and 4×10^1 CFU/ml, respectively, after incubation for 2 h, representing a decrease of the initial population of 99.99% (Fig. 3.4.C). Interestingly, no viable counts were obtained neither at 6 h of treatment nor after incubation for 15 days. The addition of 680 BU/ml of CS also resulted in a rapid decreased in viable counts, although the bactericidal effect was much slower. In this respect, 5×10^3 and 9×10^2 CFU/ml viable counts were obtained at 2 and 36 h of incubation, respectively, representing a decrease of the initial population of 95 and 99.2%, respectively. At this point, the viable counts began to increase and reached 2×10^9 CFU/ml after 72 h. On the contrary, the addition of 136 BU/ml of CS resulted in a bacteriostatic effect for approximately 6 h, and, subsequently, viable counts began to increase and reached 2×10^9 CFU/ml after incubation for 48 h. The addition of 1,360 and 680 BU/ml of CS to a culture of *P. damnosus* CECT4797 (initial population of 3×10^3 CFU/ml) resulted in a more rapid and drastic decrease in viable counts since no viable counts were obtained neither at 2 h of treatment nor after incubation for 15 days (Fig. 3.4.D). The addition of 136 BU/ml of CS also resulted in a rapid decreased in viable cell numbers, however, the bactericidal effect was less pronounced. In this respect, 2×10^2 and 1×10^1 CFU/ml viable counts were obtained at 2 and 6–12 h of incubation, respectively, representing a decrease of the initial population of 93.3 and 99.6%, respectively. At this point, the viable counts began to increase and reached 1×10^9 CFU/ml after 72 h. In the control assays, *P. damnosus* CECT4797 grew to 4×10^9 and 5×10^9 CFU/ml at 48 and 36 h of incubation, respectively, and 2×10^4 and 3×10^4 CFU/ml viable counts were obtained, respectively, after incubation for 15 days. As expected from the results obtained by the ADT (Table III.2), *Lb. lindneri* DSMZ20690 was not sensitive to *E. faecium* L50 bacteriocins even when a high bacteriocin concentration was used (68,000 BU/ml).

Second, the bactericidal effect of *E. faecium* L50 bacteriocins against *Lb. brevis* NFBC108 in hopped and unhopped wort was determined (Fig. 3.5). The addition of 6,545; 3,272 and 1,636 BU/ml of CS from *E. faecium* L50 to cultures of *Lb. brevis* NFBC108 grown in hopped and unhopped wort (initial population of $4\text{--}5 \times 10^5$ CFU/ml) resulted in a drastic decrease in viable counts down to approximately 2×10^3 CFU/ml after incubation for 24 h, representing a decrease of the initial population

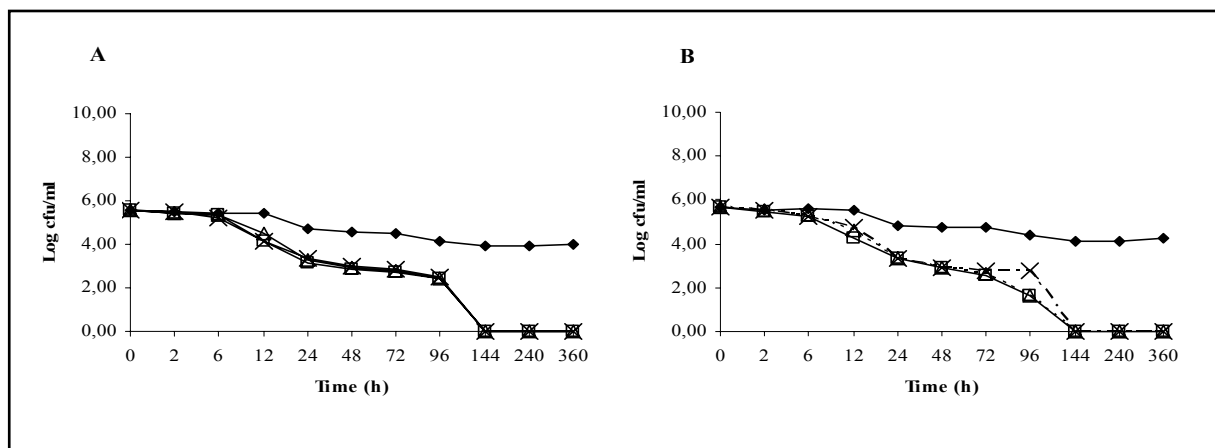


Figure 3.5. Effect of *E. faecium* L50 bacteriocins on *Lb. brevis* NFBC108 ($4\text{--}5 \times 10^5$ CFU/ml) grown in hopped wort (A), and unhopped wort (B) at 32°C. The CS was added at the following concentrations: 1,636 (×), 3,272 (□), and 6,545 BU/ml (Δ). The effect of the addition of 20-fold-concentrated hopped and unhopped wort are shown as controls (♦).

of approximately 99.5 %. Interestingly, no viable counts were obtained neither at 6 days of treatment nor after incubation for 15 days. In the control assays, *Lb. brevis* NFBC108 was shown to be unable to grow in hopped and unhopped wort, although 1×10^4 CFU/ml were obtained after incubation for 15 days in these substrates.

Third, the bactericidal effect of *E. faecium* L50 bacteriocins against *Lb. brevis* NFBC108 in alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beer (filter-sterilized) was determined (Fig. 3.6). The addition of 3,272 and 1,636 BU/ml of CS from *E. faecium* L50 to a culture of *Lb. brevis* NFBC108 (initial population of 4×10^5 CFU/ml) grown in alcoholic (5% ethanol, vol/vol) lager beer resulted in a rapid decrease in viable counts down to approximately 1×10^3 CFU/ml after incubation for 2 h, representing a decrease of the initial population of 99.75% (Fig.3.6.A). Viable counts decreased during further incubation, and no viable counts were obtained neither at 48–72 h of treatment, respectively, nor after incubation for 6 days. In contrast, the addition of 3,272 BU/ml of CS to a culture of *Lb. brevis* NFBC108 (initial population of approximately 4×10^5 CFU/ml) grown in low-alcoholic (1% ethanol, vol/vol) lager beer resulted in a more rapid and drastic decrease in viable counts down to 8×10^1 CFU/ml after incubation for 2 h, representing a decrease of the initial population of 99.98%, and no viable counts were obtained neither at 12 h of treatment nor after incubation for 6 days (Fig. 3.6.B). The addition of 1,636 BU/ml of concentrated supernatant also resulted in a rapid decrease in viable cell numbers, however, the bactericidal effect was slower. In this respect, 2×10^3 CFU/ml viable counts were obtained after incubation for 2 h, representing a decrease of the initial population of 99.5%, and no viable counts were obtained neither at 48 h of treatment nor after incubation for 6 days. Finally, the addition of 3,272 BU/ml of CS from *E. faecium* L50 to cultures of *Lb. brevis* NFBC108 (initial population of approximately 4×10^5 CFU/ml) in non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beer resulted in a rapid and drastic decrease in viable counts down to 1×10^2 CFU/ml after incubation for 2 h, representing a decrease of the initial population of 99.97%, and no

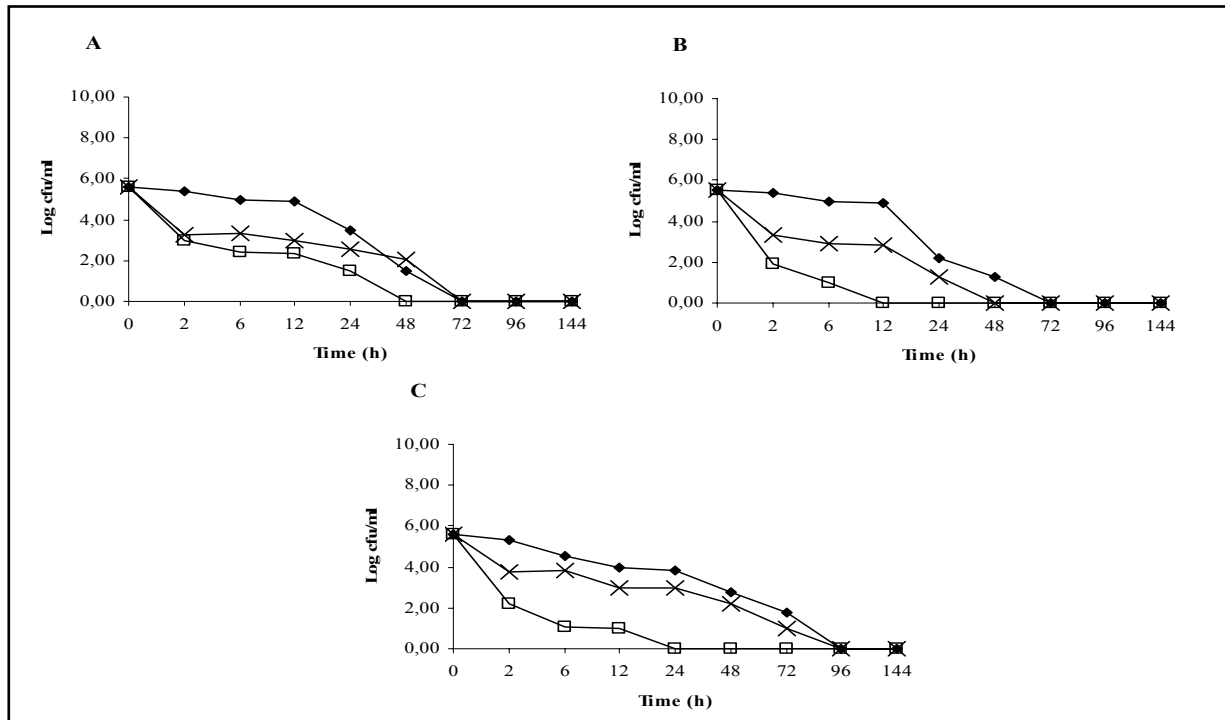


Figure 3.6. Effect of *E. faecium* L50 bacteriocins on *Lb. brevis* NFBC108 (4×10^5 CFU/ml) grown in alcoholic lager beers (5% ethanol, vol/vol [A]; 1% ethanol, vol/vol [B]) and non-alcoholic lager beer (C) at 32°C. The CS was added at the following concentrations: 1,636 (×), and 3,272 BU/ml (□). The effect of the addition of 20-fold-concentrated alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers are shown as controls (♦).

viable counts were obtained neither at 24 h of treatment nor after incubation for 6 days (Fig. 3.6.C). The addition of 1,636 BU/ml of CS also resulted in a rapid decrease in viable counts, however, the bactericidal effect was slower. In this respect, 5×10^3 CFU/ml viable counts were obtained after incubation for 2 h, representing a decrease of the initial population of 98.75%, and no viable counts were obtained neither at 96 h of treatment nor after incubation for 6 days. In the control assays, it was shown that *Lb. brevis* NFBC108 did not to grow in alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers, but survived in these substrates for 72–96 h. It is worthy to note that the regrowth of the cells of *P. damnosus* CECT4797 and *Lb. brevis* NFBC108 in the experiments cited above using small amounts of CS was due to an insufficient amount of bacteriocins in the challenge tests, and not to a bacteriocin resistance phenotype of the survivors, since when these cells were grown in MRS broth and tested by an MPA they showed the same bacteriocin sensitivity as the respective parental cells (results not shown).

III.4.6. Effect of temperature on enterocin L50 (L50A and L50B) activity during the brewing process and storage

The stability of EntL50 (EntL50A and EntL50B) during varying exposures of CS from *E. faecium* L50 diluted in wort (hopped and unhopped) and alcoholic (5% ethanol, vol/vol) lager beer to different

temperatures, and after long-term storage at 8 and 25°C was determined by an ADT using *Lb. brevis* NFBC108 (EntL50^s-EntP^r-EntQ^r) as indicator microorganism. The results shown in Fig. 3.7 and Table III.6 demonstrate that EntL50 (EntL50A and EntL50B) withstood the heat treatments commonly used in the brewing industries for mashing (consecutive heating at 45, 62, 72 and 78°C for 30 min, in unhopped wort), wort boiling (100°C for 90 min, in hopped wort), fermentation (15°C for 6–10 days, in hopped wort), and pasteurization (65°C for 40 min, and 75°C for 10 min, in lager beer). In this respect, even after the more severe or longer treatment for mashing, wort boiling, fermentation and pasteurization, the samples showed a residual antimicrobial activity of 82, 62, 65 and 93–97%, respectively. Likewise, EntL50 (EntL50A and EntL50B) retained an 88 and a 52% of their original antimicrobial activity after long-term storage in alcoholic (5% ethanol, vol/vol) lager beer at 8 and 25°C for 30 days, respectively.

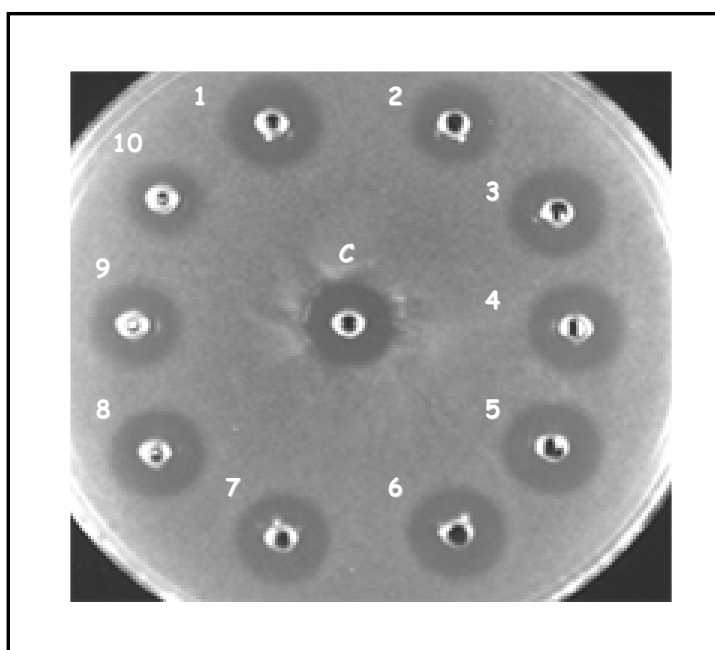


Figure 3.7. Stability of EntL50 (EntL50A and EntL50B) during varying exposures of CS from *E. faecium* L50 diluted in wort (hopped and unhopped) and alcoholic (5% ethanol, vol/vol) lager beer to different temperatures and long-term storage at 8 and 25°C. UW, 78°C–30 min (1); HW, 100°C–90 min (2); HW, 15°C–6 days (3); HW, 15°C–10 days (4); LB, 65°C–20 min (5); LB, 65°C–40 min (6); LB, 75°C–1 min (7); LB, 75°C–10 min (8); storage in LB at 8°C (9) and 25°C (10) for 30 days. The residual antimicrobial activity was determined by an ADT using *Lb. brevis* NFBC108 (EntL50^s-EntP^r-EntQ^r) as indicator microorganism. Untreated concentrated supernatant diluted in hopped wort (HW) (control) (C). Abbreviations: UW, unhopped wort; LB, lager beer (5% ethanol, vol/vol).

Table III.6. Stability of EntL50 (EntL50A and EntL50B) during varying exposures of 20-fold concentrated supernatant from *E. faecium* L50 diluted in wort (hopped and unhopped) and alcoholic (5% ethanol, vol/vol) lager beer to different temperatures, and after long-term storage at 8 and 25°C

	Antimicrobial activity (AA) ^a		
	Diameter ^b	Area ^c	Residual AA (%)
Brewing process			
Mashing (UW)			
Control	16.8	3,866	100
45°C – 30 min	16.6	3,761	97
62°C – 30 min	16.3	3,606	93
72°C – 30 min	16.2	3,555	92
78°C – 30 min	15.4	3,158	82
Wort boiling (HW)			
Control	17.0	3,972	100
100°C – 10 min	16.2	3,555	90
100°C – 20 min	15.6	3,256	82
100°C – 40 min	15.2	3,062	77
100°C – 60 min	14.7	2,827	71
100°C – 90 min	13.9	2,468	62
Fermentation (HW)			
Control	17.0	3,972	100
15°C – 6 d	15.5	3,207	81
15°C – 10 d	14.2	2,601	65
Pasteurization (LB)			
Control	16.6	3,761	100
65°C – 20 min	16.4	3,657	97
65°C – 30 min	16.4	3,657	97
65°C – 40 min	16.4	3,657	97
75°C – 1 min	16.5	3,709	99
75°C – 5 min	16.4	3,657	97
75°C – 10 min	16.1	3,504	93
Storage (LB)			
Control	16.6	3,761	100
8°C – 30 d	15.7	3,305	88
25°C – 30 d	12.7	1,967	52

^aAntimicrobial activity against *Lb. brevis* NFBC108 (EntL50⁺-EntP⁺-EntQ⁺) as determined by an ADT. Untreated concentrated supernatant diluted in unhopped wort (UW), hopped wort (HW), and lager beer (5% ethanol, vol/vol) (LB) were used as controls.

^bResults as the diameter of inhibition zones (mm).

^cResults as the area of the inhibition zones (mm²/ml).

III.5. DISCUSSION

Despite the evergrowing number of reports dealing with the effectiveness of bacteriocins in biological control of food-spoilage and pathogenic bacteria in a wide variety of foods, little effort has been directed to date to the potential application of these natural compounds as beer-biopreservatives. In this respect, some reports have shown the ability of NisA to inhibit beer-spoilage microorganisms with no detrimental effects on the brewery yeasts and the taste of the final products (Ogden and Tubb, 1985; Ogden, 1986; Ogden *et al.*, 1988; Daeschel *et al.*, 1991; Delves-Broughton *et al.*, 1996; Nauth, 2002). Moreover, it has been reported the isolation and characterization of bacteriocin producing LAB within the species *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus mundtii*, *E. faecalis*, *E. faecium*, and *Lc. lactis* from malted barley (O'Mahony *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2001), raw barley and beer-

spoilage LAB. The bacteriocins characterized in these studies include novel peptides, such as the pediocin-like sakacin 5X and the two-peptide 5T, as well as bacteriocins nearly or completely identical to various previously identified pediocin-like bacteriocins, such as sakacin P, leucocin A, leucocin C and mesentericin Y105 (Vaughan *et al.*, 2001). In our work, six broad antimicrobial spectrum bacteriocinogenic LAB previously isolated from Spanish-dry fermented sausages were challenged under the same experimental conditions against 34 beer-spoilage LAB belonging to the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus*, which are the major spoilage microorganisms throughout the brewing process and may cause important economic losses for the brewing industry (Ingledew, 1979; Hartnett *et al.*, 2002; Sakamoto and Konings, 2003). These bacteriocinogenic LAB strains exerted an heterogeneous direct antagonistic activity against the targeted 34 beer-spoilage LAB similar to that found in the respective supernatants, suggesting that the microbial inhibition was due indeed to the production of bacteriocin(s). In this sense, *Lc. lactis* BB24 (NisA producer), *E. faecium* L50 (EntL50 [EntL50A and EntL50B], EntP and EntQ producer), *Lb. sakei* 148 (Las producer) and, to a lesser extent, *P. acidilactici* 347 (PedPA-1 producer) displayed a broad antimicrobial spectrum. However, *E. faecium* P13 (EntP producer) and *E. faecium* T136 (EntA and EntB producer) showed a similar and very limited antimicrobial spectrum, being remarkable that none of the tested strains of *Lb. brevis* (7 strains), *Lb. lindneri* (3 strains) and only three out of 11 strains of *P. damnosus* resulted inhibited by these bacteriocins. The broad antimicrobial spectrum of NisA against beer-spoilage LAB is in agreement with data previously reported (Ogden and Tubb, 1985; Ogden, 1986; Ogden *et al.*, 1988; Daeschel *et al.*, 1991; Delves-Broughton *et al.*, 1996). Although EntL50, Las and PedPA-1 are known to inhibit the growth of food-spoilage and pathogenic bacteria (Cintas *et al.*, 1998b; Eijsink *et al.*, 1998), the present study represents the first evidence on their effectiveness as inhibitors of bacteria that may compromise beer quality. On the other hand, the lack of effectiveness of EntA, EntB and EntP against lactobacilli and pediococci is not surprising since it has been previously shown that these broad spectrum bacteriocins are very active against *Listeria* spp. and other pathogenic bacteria but not against LAB (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997). A major concern regarding the use of bacteriocins as food-biopreservatives is the spontaneous emergence of resistant bacteria that later regrow (Rekhif *et al.*, 1994). Most studies regarding this topic have been focused on NisA and PedPA-1 resistance in the recalcitrant food-borne pathogen *L. monocytogenes*, revealing that bacteriocin resistances develop at relatively high frequencies, ranging from 10^{-9} to 10^{-5} and from 10^{-6} to 10^{-3} , respectively (Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Dykes and Hastings, 1998; Rasch and Knöchel, 1998; Bouttefroy and Millière, 2000; Gravesen *et al.*, 2002a). It has been reported that PedPA-1 resistance in *L. monocytogenes* develops by an “all-or-none” type mechanism, while NisA resistance is a gradually increasing phenotype (Gravesen *et al.*, 2001). Interestingly, similar results have been obtained in the present work with the LAB *P. damnosus* CECT4797, since PedPA-1 fully resistant mutants were obtained after four successive growth cycles in the presence of a supernatant from *P. acidilactici* 347 (540 BU/ml), while 13 successive exposures to a supernatant from *Lc. lactis* BB24 (9,200 BU/ml) were needed to generate mutants not displaying full bacteriocin resistance but showing a stepwise and significant increase in NisA resistance (2,750-fold increase compared to the parental strain). However, the mutants generated

after 20 successive growth cycles of *P. damnosus* CECT4797 in the presence of a supernatant from *E. faecium* L50 (275 BU/ml) only showed a 300-fold increase in resistance. This phenomenon is likely due to the presence of three distinct bacteriocins (four peptides) (*i.e.*, EntL50 [EntL50A and EntL50B], EntP and EntQ) belonging to different classes, showing different antimicrobial spectra, acting synergistically (at least EntL50A and EntL50B, see below), and maybe possessing distinct mechanisms of action. In this sense, our results suggest that although EntQ lacks antimicrobial activity by itself, it may facilitate the action of EntL50 and/or EntP, as it has been previously described for other bacteriocin combinations (Mazzotta and Montville, 1997; Limonet *et al.*, 2002). Moreover, *in vitro* synthesis of EntL50A and EntL50B separately and together showed that both peptides possess antimicrobial activity by themselves against beer-spoilage bacteria, but its combined action enhances the activity much more than the additive effect of the peptides acting independently. In a previous report, we have already described a synergistic mode of action of EntL50A and EntL50B against other LAB strains (Cintas *et al.*, 1998a), and this synergism has been also described for other two-peptide bacteriocins (Allison *et al.*, 1994; Cintas *et al.*, 1995; Jiménez-Díaz *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 1999a) and bacteriocins belonging to different classes produced by a multiple producer strain (Hanlin *et al.*, 1993; Casaus *et al.*, 1997; Mulet-Powell *et al.*, 1998; Bouttefroy and Millière, 2000; Vignolo *et al.*, 2000; Limonet *et al.*, 2004a). Moreover, it is well known that multiple bacteriocin production may increase the antimicrobial activity and spectrum of the producer strain, as well as contribute to reduce the frequency at which bacteriocin-resistant populations develop (Hanlin *et al.*, 1993; Deegan *et al.*, 2006). It is interesting to note that resistant phenotypes generated in *P. damnosus* CECT4797 were stable after many generations even in the absence of the respective bacteriocins, which agree with data reported for certain strains of *L. monocytogenes* mutants resistant to NisA as well as PedPA-1 and other class II bacteriocins (Rekhif *et al.*, 1994; Duffes *et al.*, 2000; Gravesen *et al.*, 2002a). However, other authors have observed a high stability of the PedPA-1 resistance phenotype but a NisA resistance phenotype stability highly varying depending on the specific *L. monocytogenes* strain or even isolate (Dykes and Hastings, 1998; Gravesen *et al.*, 2002a), and therefore our data should not be extrapolated to other *P. damnosus* strains.

Recently, Gravesen *et al.* (2002b) suggested that class IIa bacteriocin resistance is conferred by the same general mechanism in *L. monocytogenes*, *Listeria innocua* and *E. faecalis*, and conceivably also in some other Gram-positive bacteria, irrespective of wild-type strain, class IIa bacteriocin or tested environmental conditions. The existence of one prevalent mechanism, characterized by the prevention of synthesis of the mannose-specific phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS), EII^{Man}, and upregulation of the putative β -glucoside-specific PTS enzyme II, EII^{Bgl}, and phospho- β -glucosidase (Gravesen *et al.*, 2002b), would explain the frequently reported observation that mutants resistant to a class IIa bacteriocin display cross-resistance toward noncognate class IIa bacteriocins (Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Dykes and Hastings, 1998; Rasch and Knöchel, 1998; Ramnath *et al.*, 2000; Gravesen *et al.*, 2002b). With respect to class I bacteriocins (lantibiotics), to date only NisA resistance has been investigated in detail revealing the involvement of several mechanisms such as alterations in the cell wall, membrane fatty acid and/or phospholipid composition

(Guinane *et al.*, 2006). As described above for class II bacteriocins, cross-resistance between class I bacteriocins has also been previously reported (Gravesen *et al.*, 2001; Guinane *et al.*, 2006). Moreover, it has been frequently described that mutants resistant to bacteriocins within the class IIa group are not protected against lantibiotics or bacteriocins belonging to other classes and *vice versa* (Hanlin *et al.*, 1993; Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Rasch and Knøchel, 1998; Guinane *et al.*, 2006). However, Gravesen *et al.* (2002a) reported that one strain of *L. monocytogenes* developed simultaneous resistance to PedPA-1 and NisA at a frequency of 10^{-6} . Similarly, we have observed in our study that mutants of *P. damnosus* CECT4797 resistant to PedPA-1 (class IIa), NisA (class I) and enterocins from *E. faecium* L50 (belonging to class IIa, IIb and IIc) showed a significant increased cross-resistance to NisA and enterocins from *E. faecium* L50, PedPA-1 and enterocins from *E. faecium* L50, and PedPA-1 and NisA, respectively. Therefore, unravelling the mechanism(s) by which beer-spoilage LAB acquire bacteriocin resistance is a challenging task that should be addressed before application of bacteriocins as beer-biopreservatives.

Enterococci are well known for their ability to encode potential virulence factors such as a cytolysin precursor (*cylL_L-cylL_S*), an aggregation protein (*agg*), an extracellular metalloendopeptidase (*gelE*), a cell wall-associated protein (*esp*), the cell wall adhesins expressed by *E. faecalis* (*efaA_{fs}*) and *E. faecium* (*efaA_{fm}*), and sex pheromones encoded by genes *cpd*, *cob*, *ccf* and *cad* (Eaton and Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001). Other variable traits associated with enterococcal virulence are production of hyaluronidase, production of superoxide, the accessory colonization factor (*ace*), the adhesin (*asa373*) with little homology to *agg* or *asaI*, and the regulatory locus (*fsr*) regulating expression of two *E. faecalis* extracellular virulence-related proteins (Eaton and Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001). For these reasons, the safety aspects of *E. faecium* L50 were evaluated, revealing that this strain only harbours the cell wall adhesin *efaA_{fm}* and the sex pheromone encoded by gene *ccf*, similarly as other *E. faecium* strains of food origin (Eaton and Gasson, 2001; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007b). In this respect, it should be noted that the role of *efaA_{fm}* in pathogenicity remains unknown, and that the production of sex pheromones in *E. faecium* is a common trait that mediates crosstalk between *E. faecium* and *E. faecalis* (Eaton and Gasson, 2001). Furthermore, the absence of *cylMBA* and *gelE* in *E. faecium* L50 agrees with our observation that this strains lacks production of gelatinase and β -hemolysis activity. Antibiotic resistance is a widely-distributed trait in enterococci and constitutes a specific cause for concern since it may contribute to enterococcal pathogenesis. However, the fact that *E. faecium* L50 does not manifest resistance to ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, fucsidic acid, gentamycin (10 and 120 μ g), nitrofurantoin, norfloxacin, penicillin G, rifampicin, teicoplanin, tetracycline and vancomycin reveals that this strain is susceptible to most clinically relevant antibiotics.

Once assessed the potential safety of the multiple bacteriocin producer *E. faecium* L50, and considering its broad antimicrobial spectrum, it was evaluated the effectiveness of this strain as beer-biopreservative at various stages of the brewing process. Firstly, growth, survival and bacteriocin production was investigated in different brewery substrates, which revealed that *E. faecium* L50 is lethally inactivated in hopped wort, and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers, and that this strain is unable to produce EntL50, EntP or EntQ in these

substrates. These results are not surprising since the hop compounds are known to inhibit the growth of many Gram-positive bacteria, including LAB species (Sakamoto and Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2005). In contrast, beer-spoilage LAB are able to grow in these substrates, which in most cases is at least partially due to the presence of the *horA* gene that codes for a polypeptide (HorA) that is 53% identical to LmrA, an ATP-binding cassette (ABC) multidrug transporter of *Lc. lactis* (van Veen *et al.*, 1996; Sakamoto and Konings, 2003; Vaughan *et al.*, 2004). Therefore, the possibility exists to develop genetically engineered bacteriocinogenic strains heterologously expressing HorA to function as pump excreting hop compounds, as it has been described in *Lc. lactis* (Sakamoto *et al.*, 2001). On the other hand, *E. faecium* L50 did not grow but survived in unhopped wort, although no EntL50, EntP or EntQ activity was detected in this substrate. Strikingly, when unhopped wort was supplemented with different concentrations of MRS broth (12.5, 25 and 50%, vol/vol) an initial bacterial inactivation was observed, and it was less pronounced with increasing percentages of MRS broth in the medium. Beyond this point, *E. faecium* L50 was shown to consistently grow over an extended period of time in all these media. However, the bacteriocin-negative phenotype was only reversed upon the incubation in wort supplemented with 50% MRS broth, in which the antimicrobial activity found was similar to that obtained in MRS broth. Previously, we reported that multiple-bacteriocin production by *E. faecium* L50 is a temperature-regulated process (Cintas *et al.*, 2000d; Criado *et al.*, 2006b), but considering the results described above the possibility that bacteriocin synthesis might be also regulated by other growth conditions and/or specific environmental signals can not be ruled out. In this respect, it is widely known that, besides on fermentation temperature, bacteriocin production relies on many factors such as growth media composition (*i.e.*, carbohydrates, mainly glucose; nitrogen, phosphorous, etc.), initial and final pH, and microbial growth with or without pH control (Parente and Ricciardi, 1999; Messens *et al.*, 2003). Previous reports on the capability of bacteriocinogenic LAB to grow and produce bacteriocins in brewery substrates are scarce and, to our best knowledge, limited to those reported by Hartnett *et al.* (2002) and Vaughan *et al.* (2004). In this respect, it was described that, contrarily to our results, out of six bacteriocinogenic LAB strains isolated from raw barley and sorghum, *E. faecalis* T33, *E. faecium* A33, *E. mundtii* 4, and *Lc. lactis* S33, grew and exerted inhibitory activity in unhopped wort, while *Lc. lactis* M30 and *Lc. lactis* M36 were able to grow but did not produce bacteriocins (Hartnett *et al.*, 2002). Later on, it was reported that *Lc. lactis* M30 is not able to grow in hopped wort or beer and that the respective bacteriocin is produced in unhopped wort fortified with yeast extract and dipotassium phosphate but only when the pH is stringently controlled to 6.5 (Vaughan *et al.*, 2004). Besides, it has been patented a composition providing beer and other alcoholic beverages stability against spoilage microorganisms, which is prepared by adding to the wort a nutritional supplement effective for increasing the yield of NisA, adjusting the pH to about 6.5, pasteurizing and cooling, and fermenting the medium with a nisin-producing culture (Nauth, 2002). However, our results suggest that pH-control during fermentation is not required for bacteriocin production by *E. faecium* L50, being unlikely the pH is responsible for the differences observed in bacteriocin production in the differently fortified unhopped worts since no significative differences in pH decrease kinetics were observed. Nevertheless, media composition strongly and differently

influenced *E. faecium* L50 growth and bacteriocin production, being the amount of MRS broth required for bacteriocin production four times higher than that necessary to support bacterial growth. All together, optimization of bacteriocin production by *E. faecium* L50 in wort is of great applied interest in order to use this strain as a wort bioacidifying and bacteriocin producing inoculant in the brewery industry.

On the other hand, the present study demonstrates the effectiveness of bacteriocins from *E. faecium* L50, mainly EntL50 (EntL50A and EntL50B), to eliminate the beer-spoilers *Lb. brevis* NFBC108 and *P. damnosus* CECT4797 present at high initial levels (ca., 10^3 and 10^5 CFU/ml) in MRS broth, hopped and unhopped wort, and alcoholic (1 and 5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers and kept at high temperatures (32°C). Our results reveal a bactericidal effect dependent on the growth substrate, the bacteriocin dose, and the initial contamination level. In MRS broth, it was feasible to eliminate *Lb. brevis* NFBC108 and *P. damnosus* CECT4797 present at high levels (2×10^3 and 5×10^5 CFU/ml) by the addition of 491–680 and 818–1,360 BU/ml of bacteriocins from *E. faecium* L50, respectively. However, when *Lb. brevis* NFBC108 was grown in wort and alcoholic and non-alcoholic lager beers it was necessary to add 1,636 BU/ml of bacteriocin to obtain the same bactericidal effect. Moreover, the bactericidal effect of the bacteriocins in wort (hopped and unhopped) and lager beers was slower than in MRS broth. The lower effectiveness of *E. faecium* L50 bacteriocins in wort and lager beers compared to MRS broth could be attributed to their interaction with certain compounds (e.g., carbohydrates, proteins and lipids) present in the wort and, to a lesser extent, in the lager beers, and/or to their slower diffusion in these substrates. Notwithstanding that no studies have been performed yet on the interaction of bacteriocins with wort or beer ingredients, it is widely known that bacteriocin activity may be influenced by the chemical composition and the physical conditions of food. In this context, a reduced efficiency of NisA and other bacteriocins in certain types of foods due to their interaction with lipid and/or protein moieties has been reported (Cleveland *et al.*, 2001; Aasen *et al.*, 2003). On the other hand, the increased effectiveness of the bacteriocins in lager beers compared to wort may be partially due to their synergistic effect with other antimicrobials present in these substrates (e.g., alcohol, hop compounds, organic acids, and metabisulfite). In this sense, the synergistic effect of NisA and other bacteriocins with alcohol, metabisulfite, sodium lactate, potassium sorbate and citric acid has been reported (Brewer *et al.*, 2002; Bari *et al.*, 2005; Al-Holy *et al.*, 2006; Ananou *et al.*, 2007; Rojo-Bezares *et al.*, 2007a). Irrespective of that, the results described above reveal that it is feasible to eliminate *Lb. brevis* NFBC108 from wort and lager beers using *E. faecium* L50 bacteriocins, mainly EntL50, even when this beer-spoilage bacteria is present at a high contamination level ($4\text{--}5 \times 10^5$ CFU/ml). Contrarily to our results, Vaughan *et al.* (2004) reported that the bacteriocin produced by *Lc. lactis* M30 only resulted active to eliminate *Lb. brevis* BSH9 from beer when this beer-spoilage strain was present at a low initial contamination level (ca., 1×10 CFU/ml). Moreover, our results reveal the effectiveness of *E. faecium* L50 bacteriocins to avoid the emergence and development of resistant populations, which is of great applied interest since, as mentioned above, this constitutes a major concern regarding the use of bacteriocins as food-biopreservatives.

Finally, our results revealed that EntL50 in wort and/or lager beer withstood the heat treatments commonly applied in the brewing industries during mashing, wort boiling, fermentation and pasteurization. Likewise, EntL50 retained most of its antimicrobial activity in lager beer (5% ethanol, vol/vol) after long-term storage at 8 and 25°C. All together, these results suggest that EntL50 could be applied at all stages of the brewing process and in the packaged beer. Recently, Vaughan *et al.* (2004) described that the bacteriocin produced by *Lc. lactis* M30 could not be detected after fermentation for 12 h and boiling in wort, but partially retained its activity in beer following pasteurization, storage at 30°C, and refrigeration and freezing.

In conclusion, *E. faecium* L50 possesses the following interesting characteristics as beer-biopreservative: (i) EntL50 (EntL50A and EntL50B) inhibits the growth of many beer-spoilage LAB, (ii) *E. faecium* L50 may be considered as an avirulent strain showing susceptibility to most clinically relevant antibiotics, (iii) *E. faecium* L50 is not able to grow in wort and lager beer, and thus would not spoil these substrates, but grows and produces EntL50 (EntL50A and EntL50B) in modified wort, and therefore could be used for wort bioacidification and spoilage biocontrol, (iv) *E. faecium* L50 bacteriocins, mainly EntL50 (EntL50A and EntL50B), exert a bactericidal effect against the beer-spoilers *P. damnosus* CECT4797 and *Lb. brevis* NFBC108 in MRS broth, wort and lager beers, and do not allow the development of bacterial resistances even after incubation for 6–15 days, and (v) EntL50 (EntL50A and EntL50B) is thermoresistant to the heat treatments commonly used in the brewing industries, and withstands long-term storage at refrigeration and room temperatures. Moreover, production of *E. faecium* L50 bacteriocins is differently regulated at temperatures ranging from 16 to 47°C (Cintas *et al.*, 2000d; Criado *et al.*, 2006b), and these bacteriocins are stable over a wide pH range (2–11) (Cintas *et al.*, 1995). All these results encourage further evaluation of *E. faecium* L50 and its bacteriocins, mainly EntL50 (EntL50A and EntL50B), as beer-biopreservatives at various stages of the brewing process. In this respect, promising experiments are in progress to develop genetically engineered *Sc. cerevisiae* strains heterologously producing and secreting biologically active EntL50 (EntL50A and EntL50B), which could lead to the further development of bactericidal *Sc. cerevisiae* brewing yeasts to be used as a part of a hurdle preservation technology to obtain safer and more stable beers by eliminating beer-spoilage bacteria and reducing the use of chemical preservatives.

III.6. REFERENCES

- Aasen, I. M., S. Markussen, T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson and K. Naterstad. 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 35–43.
- Al-Holy, M., H. Al-Qadiri, M. Lin and B. Rasco. 2006. Inhibition of *Listeria innocua* in hummus by a combination of nisin and citric acid. *J. Food Prot.* 69: 1322–1327.
- Allison, G. E., C. Fremaux and T. R. Klaenhammer. 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176: 2235–2241.
- Ananou, S., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez and E. Valdivia. 2007. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 19–23.
- Anderssen, E. L., D. B. Diep, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink and J. Nissen-Meyer. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269–2272.
- Back, W. 1994. Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt Int.* 4: 326–328.
- Bari, M. L., D. O. Ukuku, T. Kawasaki, Y. Inatsu, K. Isshiki and S. Kawamoto. 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J. Food Prot.* 68: 1381–1387.
- Bouttefroy, A. and J. B. Millière. 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 65–75.
- Brewer, R., M. R. Adams and S. F. Park. 2002. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 18–21.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes and P. E. Hernández. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Chen, H. and D. G. Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 2: 82–100.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández and H. Holo. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Håvarstein, P. E. Hernández and I. F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes and L. S. Håvarstein. 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández and P. E. Hernández. 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández and I. F. Nes. 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes and P. E. Hernández. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7: 281–305.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.

- Cotter, P. D., C. Hill and R. P. Ross.** 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Criado R., D. B. Diep, Å. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández and L. M. Cintas.** 2006a. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6653–6666.
- Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P. E. Hernández and L. M. Cintas.** 2006b. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7634–7643.
- Daeschel, M. A. and H. P. Fleming.** 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiol.* 1: 303–313.
- Daeschel, M. A., D. -S. Jung and B. T. Watson.** 1991. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 601–603.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill and P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans and J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193–202.
- Dequin, S.** 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 56: 577–588.
- Diep, D. B. and I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Douglas, P., F. J. Meneses and V. Jiranek.** 2006. Filtration, haze and foam characteristics of fermented wort mediated by yeast strain. *J. Appl. Microbiol.* 100: 58–64.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen and H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Du Toit, M. and I. S. Pretorius.** 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 74–96.
- Duffes, F., P. Jenoe and P. Boyaval.** 2000. Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4318–4324.
- Dykes, G. A. and J. W. Hastings.** 1998. Fitness costs associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* B73. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 5–8.
- Eaton, T. J. and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
- Eijsink, V. G. H., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg and I. F. Nes.** 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275–3281.
- Fernandez, J. L. and W. J. Simpson.** 1995. Measurement and prediction of the susceptibility of lager beer to spoilage by lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 419–425.
- Franz, C. M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings and W. H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385–4389.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel and A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Garneau, S., N. I. Martin and J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.

- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall and D. B. Clewell. 1994. Genetic structure of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335–7344.
- Gravesen, A., K. Sørensen, F. M. Aarestrup and S. Knøchel. 2001. Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb Drug Resist.* 7: 127–135.
- Gravesen, A., A. -M. J. Axelsen, J. M. da Silva, T. B. Hansen and S. Knøchel. 2002a. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 756–764.
- Gravesen, A., M. Ramnath, K. B. Rechinger, N. Andersen, L. Jänsch, Y. Héchard, J. W. Hastings and S. Knøchel. 2002b. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 148: 2361–2369.
- Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill and R. P. Ross. 2006. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lactacin 3147. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 77–83.
- Hanlin, M. B., N. Kalchayanand, P. Ray and B. Ray. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56: 252–255.
- Hartnett, D. J., A. Vaughan and D. van Sinderen. 2002. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.* 108: 169–177.
- Holo H., O. Nissen and I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Inglelew, W. M. 1979. Effect of bacterial contamination on beer. A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 37: 145–150.
- Jespersen, L. and M. Jakobsen. 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 139–155.
- Jiménez-Díaz, R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten and P. J. Warner. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459–4463.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–86.
- Lewis, D. 1998. Biological mash and wort acidification. *New Brewer* 15: 36–45.
- Limonet, M., A. -M. Revol-Junelles and J. -B. Millière. 2002. Variations in the membrane fatty acid composition of resistant or susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* strains in the presence or absence of mesenterocin 52A and mesenterocin 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2910–2916.
- Limonet, M., A. -M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal and J. -B. Millière. 2004a. Synergistic mode of action of mesenterocins 52A and 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Curr. Microbiol.* 48: 204–207.
- Linko, M., A. Haikara, A. Ritala and M. Penttilä. 1998. Recent advances in the malting and brewing industry. *J. Biotechnol.* 65: 85–98.
- March, C., J. J. Manclús, A. Abad, A. Navarro and A. Montoya. 2005. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods* 303: 92–104.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernández. 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69: 520–531.

- Mazzotta, A. S. and T. J. Montville.** 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *J. Appl. Microbiol.* 82: 32–38.
- Messens, W., J. Verluysen, F. Leroy and L. de Vuyst.** 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 41–52.
- Moll, G. N., E. van den Akker, H. H. Hauge, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, W. N. Konings and A. J. M. Driessen.** 1999a. Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J. Bacteriol.* 181: 4848–4852.
- Moreira, W. L.** 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- Mulet-Powell, N., A. M. Lacoste-Armynot, M. Viñas and M. S. de Buochberg.** 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 61: 1210–1212.
- Nauth, K. R.** 2002. Prevention of lactic acid bacteria spoilage of beer through the use of bacteriocin-containing fermented wort. *U.S. Patent:* 0192331A1.
- NCCLS.** 2002. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelfth Informational Supplement of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Handbook, vol. 21.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havårstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F., D. B. Diep and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- O'Mahony, A., T. O'Sullivan, Y. Walsh, A. Vaughan, M. Maher, G. F. Fitzgerald and D. van Sinderen.** 2000. Characterization of antimicrobial producing lactic acid bacteria from malted barley. *J. Inst. Brew.* 106: 403–410.
- Ogden, K.** 1986. Nisin: a bacteriocin with a potential use in brewing. *J. Inst. Brew.* 92: 379–383.
- Ogden, K. and R. S. Tubb.** 1985. Inhibition of beer spoilage lactic acid bacteria by nisin. *J. Inst. Brew.* 91: 390–392.
- Ogden, K., M. J. Waites and J. R. M. Hammond.** 1988. Nisin and brewing. *J. Inst. Brew.* 94: 233–238.
- Parente, E. and A. Ricciardi.** 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 628–638.
- Ramnath, M., M. Beukes, K. Tamura and J. W. Hastings.** 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3098–3101.
- Rasch, M. and S. Knöchel.** 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 275–278.
- Rekhif, N., A. Atrih and G. Lefebvre.** 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.* 28: 237–241.
- Ringø, E., U. Schillinger and W. Holzapfel.** 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: “*Microbial Ecology of the Growing Animal*, 2”, pp. 408–443. Holzapfel, W. and P. Naughton (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, United Kingdom.
- Rojo-Bezares, B., Y. Sáenz, M. Zarazaga, C. Torres and F. Ruiz-Larrea.** 2007a. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 32–36.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney and C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 337–346.

- Ross, R. P., S. Morgan and C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Sakamoto, K. and W. N. Konings.** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 105–124.
- Sakamoto, K., A. Margolles, H. W. van Veen and W. N. Konings.** 2001. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multifrug transporter HorA. *J. Bacteriol.* 183: 5371–5375.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernández.** 2007b. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food. Microbiol.* 117: 295–305.
- Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks and I. S. Pretorius.** 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647–656.
- Skaugen, M., L. M. Cintas and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, EE.UU.
- Sobrinho, O. J.** 1993. Caracterización parcial, bioquímica e inmunológica, de una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus sake* 148. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- Todorov, S. D. and L. M. T. Dicks.** 2004. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. *Folia Microbiol.* 49: 406–410.
- Van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl and L. M. T. Dicks.** 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 29–40.
- Van Veen, H. W., K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, A. J. M. Driessen and W. N. Konings.** 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10668–10672.
- Vaughan, A., V. G. H. Eijssink, T. F. O’Sullivan, K. O’Hanlon and D. van Sinderen.** 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91: 131–138.
- Vaughan, A., S. Rouse and D. van Sinderen.** 2004. Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. *J. Inst. Brew.* 110: 181–188.
- Vaughan, A., T. O’Sullivan and D. van Sinderen.** 2005. Enhancing the microbiological stability of malt and beer - a review. *J. Inst. Brew.* 111: 355–371.
- Vignolo, G., J. Palacios, M. E. Farías, F. Sesma, U. Schillinger, W. Holzapfel and G. Oliver.** 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41: 410–416.
- Wan, J., K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, J. B. Gordon, A. Wilcock, M. W. Hickey and M. J. Coventry.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J. Appl. Microbiol.* 82: 273–280.

CAPÍTULO IV / CHAPTER IV

Desarrollo de cepas bacteriocinogénicas de *Saccharomyces cerevisiae* con la capacidad de expresar y secretar heterológamente las enterocinas L50A y L50B, los dos péptidos sin extensión N-terminal que constituyen la enterocina L50 de *Enterococcus faecium* L50

Development of Bacteriocinogenic Strains of Saccharomyces cerevisiae Heterologously Expressing and Secreting Enterocins L50A and L50B, the Two Leader-Less Peptides of Enterocin L50 from Enterococcus faecium L50

(Manuscrito enviado para su publicación en *Applied and Environmental Microbiology*)

IV.1. ABSTRACT

Enterocin L50 (EntL50) is a broad antimicrobial spectrum bacteriocin from *Enterococcus faecium* L50 consisting of two leader-less antimicrobial peptides, enterocin L50A (EntL50A) and enterocin L50B (EntL50B). In this work, the feasibility of developing genetically engineered bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously producing EntL50A and/or EntL50B was investigated. For this purpose, an expression and secretion vector for *Sc. cerevisiae*, pYABD01, was constructed by cloning the yeast gene region encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal (*MF α 1_s*), which includes the Kex2 enzyme signal cleavage site required for processing of the fusion protein, into the *Sc. cerevisiae* expression vector pYES2. The high-copy number pYABD01 vector was maintained by approximately 100% of the cells over at least 50 generations in the absence of selective pressure. The structural genes of EntL50A (*entL50A*) and EntL50B (*entL50B*) were cloned, separately and together (*entL50AB*), in pYABD01 under control of the galactose-inducible promoter P_{GAL1} to generate the plasmids pYABD02 (*entL50A*), pYABD03 (*entL50B*) and pYABD04 (*entL50AB*). These recombinant plasmids were further transformed into *Sc. cerevisiae* INVSc1 resulting in the strains *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) and *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04). By using antimicrobial assays and specific anti-LR1-KLH (for EntL50A) and anti-LR2-KLH (for EntL50B) antibodies in a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA), bacteriocin production by recombinant yeasts was detected and quantified in cell-free culture supernatants from cultures grown both in minimal and complex media (SCGR and YPGR, respectively), but no in the corresponding solid media. The maximum antimicrobial activity was found in concentrated supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (255 BU/mg cell dry weight [mgCDW]) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (165 BU/mgCDW) grown in SCGR. Likewise, *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) secreted efficiently biologically active EntL50A (8.4 and 5.2 ng/mgCDW in SCGR and YPGR, respectively) and EntL50B (24.0 and 19.1 ng/mgCDW in SCGR and YPGR, respectively). Strikingly, in the optimal medium SCGR, *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) secreted a higher amount of biologically active EntL50A (10.4 ng/mgCDW) than *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), but EntL50B was not produced. On the other hand, recombinant EntL50A and EntL50B were purified from supernatants of *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, grown in SCGR, and the mass spectrometry analyses of purified recombinant peptides showed that EntL50A is probably associated to an hitherto unknown yeast compound, and that EntL50B is correctly processed by the Kex2 enzyme. In addition, Tricine-SDS-PAGE analyses of recombinant EntL50A and EntL50B revealed one major band with the expected size and bacteriocin aggregates, that were specifically detected by Western blotting, and further shown to be biologically active by an overlay assay. Taken together, these results demonstrated the suitability of the generated segregationally stable *MF α 1_s*-containing recombinant vector pYABD01 for efficient processing and secretion of biologically active EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* through the yeast Sec system.

IV.2. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) are widely known for their ability to produce a variety of ribosomally-synthesized proteins or peptides, referred to as bacteriocins, displaying antimicrobial activity against a broad range of Gram-positive bacteria, including spoilage and food-borne pathogenic microorganisms (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). These antimicrobials may be classified into three main classes: (i) the lantibiotics, or post-translationally modified peptides; (ii) the non-modified, small, heat-stable peptides; and (iii) the large, heat-labile protein bacteriocins. Class II bacteriocins are further grouped into five subclasses: the subclass IIa (pediocin-like bacteriocins containing the N-terminal conserved motif YGNGVxC), the subclass IIb (two-peptide bacteriocins), the subclass IIc (leaderless bacteriocins), the subclass IId (circular bacteriocins), and the subclass IIE (other peptide-bacteriocins) (Garneau *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). All lantibiotics and most class II bacteriocins are synthesized as biologically inactive precursors containing an N-terminal extension (the so-called double-glycine-type leader sequence or the Sec-dependent signal peptide), which is cleaved off concomitantly with externalization of biologically active bacteriocins by a dedicated ATP-binding cassette (ABC) transporter and its accessory protein or through the Sec system, respectively (Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006). Interestingly, only a few bacteriocins described to date are synthesized without an N-terminal extension, including EntL50 (EntL50A and EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a), enterocin Q (EntQ) (Cintas *et al.*, 2000d), enterocin EJ97 (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003), and the bacteriocin LsbB (Gajic *et al.*, 2003). Recently, it has been demonstrated that secretion of the leader-less bacteriocins LsbB from *Lactococcus lactis* BGM-1, and EntQ from *E. faecium* L50 is mediated by ABC-type multidrug resistance (MDR) transporters (Gajic *et al.*, 2003; Criado *et al.*, 2006a). Most class II bacteriocins form pores that cause dissipation of the cell membrane, depletion of intracellular ATP and leakage of amino acids and ions, and subsequent cellular death (Diep and Nes, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Drider *et al.*, 2006; Diep *et al.*, 2007). The hydrophilic, cationic and highly conserved N-terminal region of class IIa bacteriocins seems to mediate bacteriocin binding to the target cell surface through electrostatic interactions, while the somewhat less conserved and more hydrophobic and/or amphiphilic C-terminal region is thought to determine their antimicrobial spectrum and to penetrate into the hydrophobic part of the target cell membrane, thereby mediating membrane leaking (Fimland *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Miller *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2000; Fimland *et al.*, 2002; Kazazic *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005a).

During the last years, there has been an increasing interest in the application of bacteriocinogenic microorganisms and/or their bacteriocins as biopreservatives to guarantee the safety and quality of foods and beverages, such as fermented vegetables and meat, dairy and fish products, wine and beer (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cleveland *et al.*, 2001; Nauth, 2002; Ross *et al.*, 2002; Ringø *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). In general terms, there are three main strategies to use bacteriocins as food biopreservatives: (i) addition of a purified/semi-purified bacteriocin preparation as a food additive; (ii) use of a substrate previously fermented by a bacteriocin-producing strain as a food ingredient, and/or (iii) inoculation of a culture to produce the bacteriocin *in situ* in

fermented foods (Stiles, 1996; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006). The lantibiotic nisin A (NisA) is the most widely characterized bacteriocin, and the only one that has been legally approved in over 50 countries as food additive for use in certain types of cheeses (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2005b). Likewise, NisA has been approved as beer additive in Australia and New Zealand at levels compliant with good manufacturing practice (Delves-Broughton *et al.*, 1996). The difficulties encountered to address the regulatory approval of new bacteriocins as food additives have spurred the development of other bacteriocin-based food biopreservation strategies. In this respect, a substrate fermented by a *Pediococcus acidilactici* strain producing the class IIa pediocin PA-1 (PedPA-1) is widely commercialized as a food ingredient termed ALTA 2341 (Cotter *et al.*, 2005b; Drider *et al.*, 2006). Moreover, much of the research on the application of class IIa bacteriocins has been focused on the selection and use of specific bacteriocin-producing bacterial cultures to control the growth of food-spoilage and pathogenic bacteria in a wide variety of foods and beverages (Drider *et al.*, 2006). Likewise, the heterologous production of class IIa bacteriocins such as PedPA-1, enterocin A, enterocin P (EntP), piscicolidin 126, mesentericin Y105 and divercin V41 by LAB such as *Lc. lactis*, and *Leuconostoc mesenteroides* has been reported (Morisset and Frère, 2002; Gibbs *et al.*, 2004; Richard *et al.*, 2004b; Ingham *et al.*, 2005; Klocke *et al.*, 2005; Drider *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2006). Interestingly, some yeasts, mainly *Sc. cerevisiae*, have a long and safe history of use as starter cultures for production of a wide variety of foods and beverages including bakery products, wine and beer (Hammond, 1995; Linko *et al.*, 1998; Schoeman *et al.*, 1999; Jespersen, 2003). Moreover, yeasts, specially *Sc. cerevisiae*, are widely recognized for their suitability for large-scale production of a diverse array of functional proteins of interest in the food, chemical and biopharmaceutical industries (Russo *et al.*, 1995; Cereghino and Cregg, 1999; Schoeman *et al.*, 1999; Pretorius, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Pretorius and Bauer, 2002; Beaulieu *et al.*, 2005; Schuller and Casal, 2005; Chemler *et al.*, 2006; Cebollero *et al.*, 2007).

Beer is a beverage with a remarkable microbiological stability and is considered as a food substrate difficult to spoil. However, some LAB, such as *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri* and *Pediococcus damnosus* are recognized as the most hazardous bacteria for breweries, being responsible for approximately a 70% of the microbial beer-spoilage incidents (Back, 1994; Jespersen and Jakobsen, 1996; Sakamoto and Konings, 2003; March *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2005). To ensure beer wholesomeness and organoleptic quality, modern breweries use, in addition to adequate hygienic practices, a variety of control measures including refrigeration, pasteurization, filtration, and, in some cases, addition of chemical preservatives such as sulphur dioxide to the end-product (Vaughan *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 2006). Nevertheless, consumer demands for less-processed and less-chemically preserved foods and beverages is rapidly increasing, which is promoting the development of alternative biocontrol strategies, such as those based on the use of bacteriocins as biopreservatives (Cleveland *et al.*, 2001; Ross *et al.*, 2002; Vaughan *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). However, beyond the strict requirements to fulfill legal regulations, the commercial application of bacteriocins as beer additives is mainly hindered by low bacteriocin production yields and increases in production costs (Ogden *et al.*, 1988; Schoeman *et al.*, 1999). Considering that *Sc. cerevisiae* is commonly used as starter culture for

brewing (Hammond, 1995; Linko *et al.*, 1998; Jespersen, 2003), a novel beer biopreservation strategy based on the development of bactericidal *S. cerevisiae* brewing strains has been proposed to overcome the aforementioned challenges (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2005). In this respect, the heterologous production of LAB bacteriocins, namely PedPA-1 from *P. acidilactici* PAC1.0, and plantaricin 423 (Plt423) from *Lactobacillus plantarum* 423, by laboratory strains of *Sc. cerevisiae* has been reported (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003), suggesting the feasibility of further development of bacteriocin-producing *Sc. cerevisiae* brewing yeasts to be used either as starter cultures conducting fermentation during brewing or as biopreservative cultures to obtain safer and more stable beers by eliminating beer-spoilage bacteria and reducing the use of chemical preservatives (Schoeman *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 2005).

EntL50 (EntL50A and EntL50B) is a plasmid-encoded (pCIZ1, *ca.*, 50 kb) two-peptide bacteriocin produced by the multiple bacteriocin producer strain *E. faecium* L50, isolated from a Spanish dry-fermented sausage (Cintas *et al.*, 1995, 1998a, b). EntL50 is composed of two highly-related leader-less antimicrobial peptides termed EntL50A and EntL50B, consisting of 44 and 43 amino acids, respectively, and sharing 72% sequence identity, which is most pronounced at the N-terminus of the molecules (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d), and thus can be categorized either in subclass IIb or IIc. The structural genes *entL50A* and *entL50B* are colinearly arranged and followed by a *rho*-independent transcriptional terminator, and Northern analyses revealed that both genes are cotranscribed in a single small bicistronic mRNA (*ca.*, 0.4 kb) (Cintas *et al.*, unpublished results; Criado, 2006). Expression *in vivo* in *E. coli* and *in vitro* coupled transcription/translation experiments revealed that *entL50A* and *entL50B* are the only genes required to obtain EntL50 activity, strongly indicating that these bacteriocins are not posttranslationally modified (Cintas *et al.*, 1998a). Besides, *in vitro* synthesis analyses also demonstrated that EntL50A and EntL50B possess antimicrobial activity on their own, being EntL50A the most active peptide, but when the two peptides were combined a synergistic effect was observed (Fig. 3.2; Table III.5) (Cintas *et al.*, 1998a; Basanta *et al.*, 2008a). Interestingly, *E. faecium* L50 also produces, under temperature regulation, two other bacteriocins: (i) the chromosomally-encoded subclass IIa Sec-dependent EntP, and (iii) the plasmid-encoded (pCIZ2, *ca.*, 7.4 kb) subclass IIc leader-less EntQ (Cintas *et al.*, 1997, 2000d; Criado *et al.*, 2006a, b). Recently, it has been demonstrated that EntP and EntQ are secreted by the Sec traslocase (Herranz and Driessen, 2005) and a dedicated ABC-type MDR transporter (Criado *et al.*, 2006a), respectively. However, the mechanism involved in secretion of EntL50 (EntL50A and EntL50B) still remains unknown, although the involvement of a multicomponent ABC transporter in bacteriocin externalization has been recently suggested (Criado, 2006). *E. faecium* L50 possesses a broad antimicrobial spectrum, mainly exerted by EntL50 (EntL50A and EntL50B), including: (i) food-borne pathogenic bacteria, such as *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes*; (ii) human and animal clinical pathogens, such as *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* and *Streptococcus pneumoniae*; and (iii) several LAB, such as *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., etc. (Cintas *et al.*, 1998b, 2000d). Moreover, a previous work suggested the potential application of EntL50 (EntL50A and EntL50B) as beer-

biopreservative based upon the following characteristics: (i) it inhibits the main beer-spoilers and exerts a bactericidal effect against *P. damnosus* and *Lb. brevis* in MRS broth, hopped and unhopped wort, and alcoholic and non-alcoholic lager beers, (ii) its use under these conditions does not allow the development of bacterial resistances (Fig. 3.4, 3.5 and 3.6), (iii) it remains biologically active after the heat treatments commonly used for brewing, and (iv) it withstands long-term storage at refrigeration and room temperatures (Fig. 3.7; Table III.6). On the other hand, *E. faecium* L50 may be considered as a putative avirulent strain showing susceptibility to most clinically relevant antibiotics. Moreover, this strain is not capable to grow in wort and lager beer, and is thus not a spoiler for these substrates. Nevertheless, *E. faecium* L50 is able to grow and produce bacteriocins in modified wort, and therefore could be used for wort bioacidification and spoilage biocontrol (Basanta *et al.*, 2008a).

Considering the aforementioned characteristics and technological properties of EntL50 (EntL50A and EntL50B) for the brewing industry, genetically engineered strains of *Sc. cerevisiae* heterologously expressing and secreting this broad spectrum two-peptide bacteriocin have been developed in this work. For this purpose, we firstly constructed an expression and secretion vector for *Sc. cerevisiae*, termed pYABD01, by cloning *MFαI_s* into the *Sc. cerevisiae* expression 2μ-episomal plasmid pYES2. Secondly, we cloned *entL50A* and *entL50B*, separately and together, in pYABD01 under control of P_{GAL1}, and expressed the fusion proteins in *Sc. cerevisiae*, which were efficiently secreted as biologically active EntL50A and EntL50B directed by MFαI_s through the yeast Sec system. The expression and secretion vector pYABD01 constructed in this work may also be useful for the heterologous production of other bacteriocins, peptides and/or proteins of interest for the food, chemical and biopharmaceutical industries.

IV.3. MATERIALS AND METHODS

IV.3.1. Microorganisms, plasmids, media, and culture conditions

The sources and relevant genotypes of microorganisms and plasmids used in this work are listed in Table IV.1. The EntL50 (EntL50A and EntL50B)-producing strain *E. faecium* L50 and the indicator strain *P. damnosus* CECT4797 (EntL50 sensitive; EntL50^s) (Table III.2) (Basanta *et al.*, 2008a) were grown aerobically in MRS broth (pH 6.2; Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 30°C. *E. coli* cells (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.) were propagated in Luria-Bertani (LB) broth (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Mo.) at 37°C with shaking (200–250 rpm). Kanamycin (Kan, 50 μg/ml), ampicillin (Amp, 50–100 μg/ml), and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal, 80 μg/ml) (Sigma-Aldrich) were added to LB medium as selective agents for selection of *E. coli* transformants. *Sc. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen) was cultured in YPD medium (10 g/l yeast extract, Oxoid; 20 g/l peptone, Oxoid; 20 g/l glucose, Panreac Química S. A., Barcelona, Spain) (Schoeman *et al.*, 1999) at 30°C with shaking (200–250 rpm). Yeast transformants were grown in YPD medium supplemented with Amp (100 μg/ml in liquid medium, and 50 μg/ml in solid medium), and/or in

Table IV.1. Microorganisms and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Source or reference ^b
Bacterial strains		
<i>Enterococcus faecium</i> L50	EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP, and EntQ producer	DNBTA
<i>Pediococcus damnosus</i> 4797	Indicator microorganism, EntL50 ^s -EntP ^s -EntQ ^f	CECT
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Host strain, F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> MAX Efficiency DH5 α	Host strain, <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi</i> -1 <i>relA1</i>	Invitrogen
Yeast strains		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	Host strain, MAT α <i>his3</i> Δ 1 <i>leu2</i> <i>trp1</i> -289 <i>ura3</i> -52. His ⁻ , Leu ⁻ , Trp ⁻ , Ura ⁻	Invitrogen
<i>Sc. cerevisiae</i> INVSc1- α	<i>Sc. cerevisiae</i> INVSc1 derivative carrying pYABD01, Amp ^r	This work
<i>Sc. cerevisiae</i> L50A-20	<i>Sc. cerevisiae</i> INVSc1 derivative carrying pYABD02, EntL50A producer, Amp ^r	This work
<i>Sc. cerevisiae</i> L50B-4	<i>Sc. cerevisiae</i> INVSc1 derivative carrying pYABD03, EntL50B producer, Amp ^r	This work
<i>Sc. cerevisiae</i> L50AB-2	<i>Sc. cerevisiae</i> INVSc1 derivative carrying pYABD04, EntL50A producer, Amp ^r	This work
Plasmids		
PCR2.1-TOPO	3.9-kb cloning vector, Amp ^r , Kan ^r	Invitrogen
pPICZ α A	<i>Pc. pastoris</i> 3.6-kb protein expression and secretion vector carrying a methanol-inducible promoter (P _{AOXI}), 5' <i>AOXI</i> region, <i>MFα1_s</i> , Zeo ^r	Invitrogen
pYES2	<i>Sc. cerevisiae</i> 5.9-kb protein expression vector carrying a galactose inducible promoter P _{GAL1} , <i>Ura3</i> , Amp ^r	Invitrogen
pRSETB- <i>entL50A</i>	pRSETB derivative carrying <i>entL50A</i>	Cintas <i>et al.</i> , 1998a
pRSETB- <i>entL50B</i>	pRSETB derivative carrying <i>entL50B</i>	Cintas <i>et al.</i> , 1998a
pTBS01	PCR2.1-TOPO derivative carrying the <i>MFα1_s</i>	This work
pTBS02	PCR2.1-TOPO derivative carrying <i>entL50A</i>	This work
pTBS03	PCR2.1-TOPO derivative carrying <i>entL50B</i>	This work
pYABD01	pYES2 derivative carrying the <i>MFα1_s</i>	This work
pYABD02	pYABD01 derivative carrying <i>entL50A</i>	This work
pYABD03	pYABD01 derivative carrying <i>entL50B</i>	This work
pYABD04	pYABD02 derivative carrying <i>MFα1_s</i> fused in frame to <i>entL50B</i>	This work

^a*MF α 1_s*, yeast gene region encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal (MF α 1_s).

^bAbbreviations: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain).

synthetic complete minimal medium SC containing 0.67% (wt/vol) yeast nitrogen base without aminoacids, 2% (wt/vol) glucose, and all the required growth factors except uracil (SC^{-Ura}) (Schoeman *et al.*, 1999). Prior to induction of production of recombinant EntL50A and EntL50B, yeast transformants were precultured both in YPD and SC^{-Ura} overnight (OD₆₀₀ of 2.0). Solid media contained 1.5 or 2% (wt/vol) agar (Oxoid) for LAB and *E. coli*, and *Sc. cerevisiae*, respectively. Soft MRS agar used in the spot-on-agar test (SPAT), described bellow, contained 0.8% (wt/vol) agar.

IV.3.2. DNA isolation and manipulation

Small and large scale plasmid DNA isolation from *E. coli* recombinants was carried out using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics S. L., Madrid, Spain) and the QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), respectively. Total genomic DNA from recombinant yeasts was isolated using the Wizard DNA Purification Kit as suggested by the manufacturer (Promega

Corporation, Madison, Wis.). Oligonucleotide primers (Table IV.2) were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). PCR amplifications were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1 µl of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 s), annealing (50 to 56°C for 30 s), and elongation (72°C for 30 to 60 s), ending with a final extension step at 72°C for 7 min in a Techgene DNA thermal cycler (Techne, Cambridge, United Kingdom). PCR fragments and plasmids were analyzed by electrophoresis on 2 and 0.8% (wt/vol) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels, respectively, at 90 V for 1 h, using the 100-bp DNA and Supercoiled DNA ladders (Invitrogen) as molecular weight markers, respectively, with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad Laboratories S. A., Madrid, Spain) used for image acquisition and computer analysis. The PCR-generated fragments were extracted from agarose gels using the Real Clean Matrix kit (Durviz S. L. U., Madrid, Spain), and purified by the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Nucleotide sequencing of both strands of purified PCR products was done using an ABI Prism BigDye cycle sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq DNA polymerase and dye-labeled terminators and an ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, Calif.) at the DNA Sequencing Service of Sistemas Genómicos (Valencia, Spain). Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), DNA restriction enzymes (New England Biolabs Inc., Beverly, Mass.), and T4 DNA ligase (Promega) were used according to the supplier's instructions. *E. coli* TOP10 and *E. coli* MAX Efficiency DH5α competent cells, as well as *Sc. cerevisiae* INVSc1 competent cells from the *S.c.* EasyCom Transformation Kit were transformed as suggested by the manufacturers (Invitrogen).

IV.3.3. Construction of the protein expression and secretion vector pYABD01 for *Saccharomyces cerevisiae*

The strategy employed for construction of pYABD01 is depicted in Fig. 4.1. The *Pichia pastoris* expression and secretion vector pPICZαA was used as DNA template for PCR amplification of a 345-bp *Hind*III-*Xba*I fragment (fragment α1), using Alfa1-*Hind*III and Alfa3-*Xba*I as specific PCR primers (Table IV.2) containing *Hind*III and *Xba*I cleavage sites, respectively. Given that pYES2 is a *Sc. cerevisiae* nonfusion vector, the fragment α1 contained a Kozak translation initiation sequence (ACGATGA) in addition to the gene region encoding the mating pheromone α-factor 1 secretion signal (*MFα₁*), which includes the Kex2 signal cleavage site (Glu-Lys-Arg) required for processing of the fusion protein, and without the Glu-Ala spacers adjacent to the Kex2 (Brake *et al.*, 1984). The purified fragment α1 was cloned into the PCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) to generate the plasmid pTBS01, which was chemically transformed into *E. coli* TOP10 competent cells. Plasmid pTBS01 was isolated from white colonies selected as described above, digested with *Hind*III and *Xba*I, and analyzed by agarose gel electrophoresis. The resulting 339-bp *Hind*III-*Xba*I cleaved fragment α1 was purified from the agarose gel, and ligated with T4 DNA ligase into the *Sc. cerevisiae* protein expression vector pYES2, previously digested with *Hind*III and *Xba*I, to give plasmid pYABD01, in which fragment α1

Table IV.2. Primers and PCR products used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence (5'-3') ^a and PCR products description ^b	Fragment(s) amplified
Primers		
Alfa1- <i>Hind</i> III	<u>AAGCTT</u> ACGATGAGATTT CCTTCAATTTTACTGC	α 1
Alfa3- <i>Xba</i> I	TCTAGAAAGCTGGCGGCCGCGCGGCTC	α 1
Alfa4- <i>Sma</i> I	CCCGGG ACGATGAGATTT CCTTCAATTTTACTG	α -L50B
L50A1- <i>Xho</i> I	<u>CTCGAG</u> AAAAGA ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGCAAAG	L50A
L50A2- <i>Xba</i> I	<u>TCTAGAGTATAACCCCGGG</u> ATTTTAAATATGTTTTTAAATCCACTCAATG	L50A
L50B1- <i>Xho</i> I	<u>CTCGAG</u> AAAAGA ATGGGAGCAATCGCAAAACTAGTGAC	L50B
L50B2- <i>Xba</i> I	<u>TCTAGAAACATTAATGTCTTTT</u> AGCCATTTTCAATTGATC	L50B and α -L50B
pYES2-F	AACCCCGGATCGGACTACTAG	α 2
pYES2-R	GCGGTGAATGTAAGCGTGAC	α 2
PCR products		
Fragment α 1	345-bp <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I fragment containing the Kozak sequence fused to <i>MFα1_s</i>	
Fragment α 2	442-bp fragment containing the Kozak sequence fused to <i>MFα1_s</i>	
Fragment L50A	170-bp <i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50A</i>	
Fragment L50B	154-bp <i>Xho</i> I- <i>Xba</i> I fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50B</i>	
Fragment α -L50A	422-bp <i>Hind</i> III- <i>Xba</i> I fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50A</i>	
Fragment α -L50B	406-bp <i>Sma</i> I- <i>Xba</i> I fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50B</i>	

^aCleavage sites for restriction enzymes are underlined in the primer; Kozak sequence (ACGATGA), and the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site (AAAAGA) of the mating pheromone α -factor 1 secretion signal (*MF α 1_s*) are shown in bold.

^b*MF α 1_s* refers to the yeast gene region encoding *MF α 1_s*, including the Kex2 cleavage site.

is under control of P_{GAL1} (inducible by galactose and repressible by glucose) and the corresponding enhancer sequences. The recombinant plasmid was chemically transformed into *E. coli* MAX Efficiency DH5 α competent cells, and transformants selected on LB plates with Amp (50 μ g/ml) at 37°C for 24 h. The plasmid pYES2 was also chemically transformed into this host, and the resulting strain was used as a control. The presence of the plasmid pYABD01 in transformed cells was confirmed by: (i) PCR amplification of a 442-bp fragment (fragment α 2) using *E. coli* colonies as DNA template, and the pYES2 specific primer pairs pYES2-F and pYES2-R; and (ii) isolation of plasmid pYABD01, digestion with *Hind*III and *Xba*I, and visualization of a 339-bp product by agarose gel electrophoresis. Confirmation of the correct nucleotide sequence of pYABD01 was done by DNA sequencing of fragment α 2 as described above. Primers used for PCR amplification of fragment α 1 and α 2 were designed from the published nucleotide sequence of plasmids pPICZ α A and pYES2 (Invitrogen website).

IV.3.4. Cloning of enterocins L50A (*entL50A*) and L50B (*entL50B*) structural genes, separately and together, in pYABD01

The strategy employed for cloning of *entL50A* and *entL50B* in pYABD01 is summarized in Fig. 4.1. The recombinant plasmids pRSETB-*entL50A* and pRSETB-*entL50B*, previously constructed by Cintas *et al.* (1998a), were used as DNA templates for the amplification of 170-bp (fragment L50A) and 154-bp (fragment L50B). PCR fragments carrying the nucleotide sequence encoding the Kex2 signal cleavage site (AAAAGA) of *MF α 1_s* fused to *entL50A* and *entL50B*, respectively, using the primer pairs L50A1-*Xho*I and L50A2-*Xba*I (for *entL50A*), and L50B1-*Xho*I and L50B2-*Xba*I (for *entL50B*) (Table IV.2). Both forward primers, L50A1-*Xho*I and L50B1-*Xho*I, contained a *Xho*I

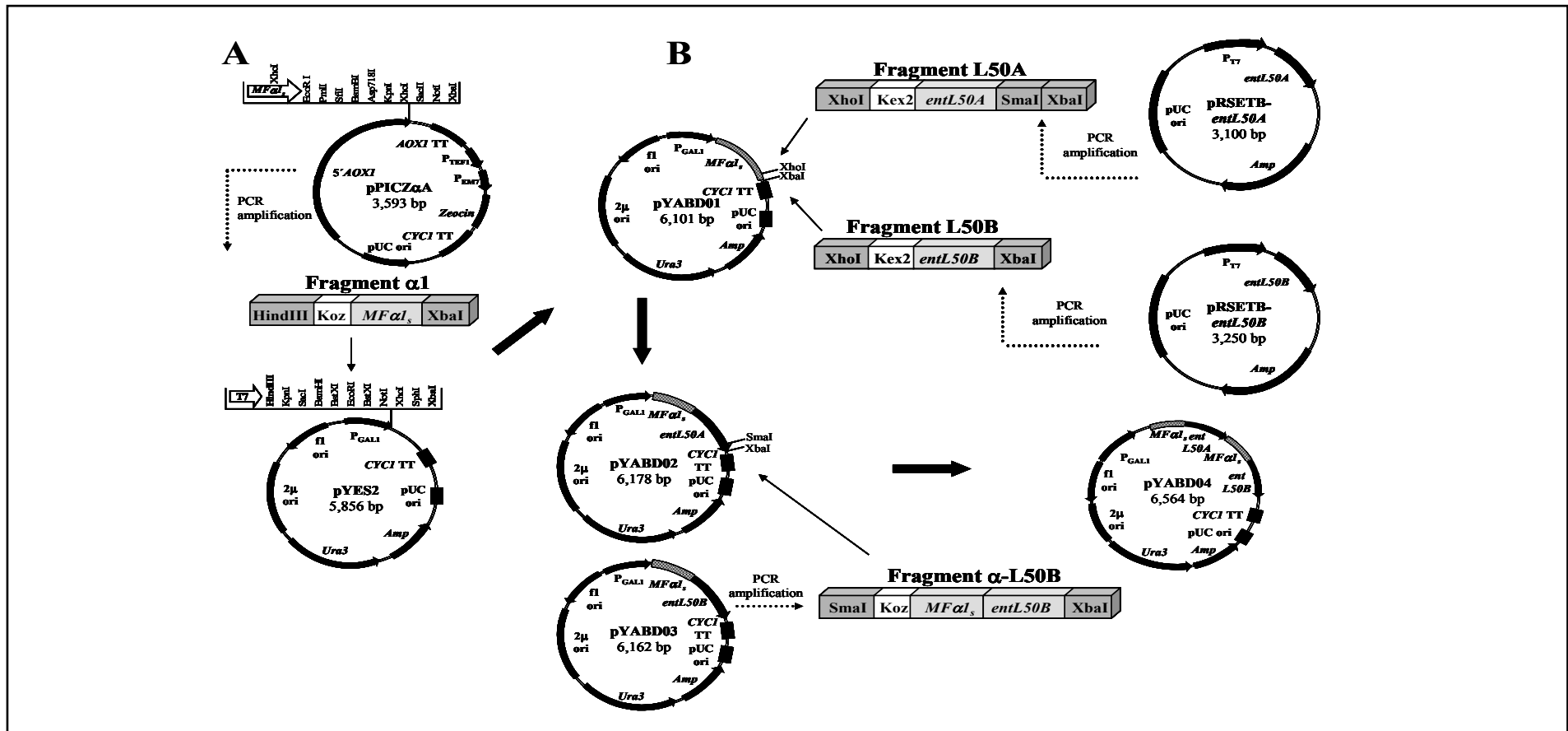


Figura 4.1. (A) Construction of the *Sc. cerevisiae* protein expression and secretion vector pYABD01, derived from pPICZαA and pYES2, containing *MFα1*, including the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site under control of P_{GAL1}. (B) Construction of the recombinant plasmids pYABD02, pYABD03 and pYABD04, derived from pYABD01, containing *MFα1*, fused in frame to *entL50A* and/or *entL50B* structural genes. Size of plasmids are given in base pairs. Only relevant restriction enzymes sites are shown. 5'AOXI, promoter region; AOXI TT, transcription termination; P_{TEF1}, transcription elongation factor 1 driving expression of *Sh ble* gene in *Pichia*; P_{EM7}, constitutive promoter driving expression of *Sh ble* gene in *E. coli*; Zeocin gene, zeocin resistance (*Sh ble* gene); CYCI TT, transcription terminator; pUC ori, maintenance and high copy replication in *E. coli*; Amp, ampicillin resistance gene; Ura3, gene for selection of yeast transformants in uracil-deficient medium; 2μ ori, maintenance and high copy replication in yeast; fl ori, rescue of single-stranded DNA; *entL50A*, structural gene of EntL50A; *entL50B*, structural gene of EntL50B; P_{T7}, T7 promoter driving expression of heterologous gene expression; Koz, Kozak translation initiation sequence of yeasts.

cleavage site, while the reversed primer L50A2-*XbaI* included a *SmaI* and *XbaI* cleavage sites, and L50B2-*XbaI* contained a *XbaI* cleavage site. The purified fragments L50A and L50B were cloned into PCR2.1-TOPO, yielding the plasmids pTBS02 and pTBS03, which were chemically transformed into *E. coli* TOP10 competent cells. Plasmids were isolated from transformants, digested with *XhoI* and *XbaI*, and analyzed by agarose gel electrophoresis. The resulting 164-bp (fragment L50A) and 148-bp (fragment L50B) fragments were purified from the agarose gels, and subsequently ligated with T4 DNA ligase into the plasmid pYABD01, previously digested with *XhoI* and *XbaI*, generating the recombinant plasmids pYABD02 and pYABD03, respectively. In these plasmids, *entL50A* and *entL50B* are fused in frame to *MFα1*, and gene expression is under control of P_{GAL1}. The recombinant plasmids were chemically transformed into *E. coli* MAX Efficiency DH5α competent cells, and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification, plasmid isolation and digestion with *XhoI* and *XbaI*. Confirmation of the correct nucleotide sequence of pYABD02 and pYABD03 was done as described above. The plasmid pYABD01 was also chemically transformed into this host, and the resulting *Sc. cerevisiae* INVSc1-α strain was used as a control.

Recombinant plasmids pYABD02 and pYABD03 (containing *Ura3*) were transformed into *Sc. cerevisiae* INVSc1 competent cells (auxotrophic for Ura), and *Sc. cerevisiae* L50A and *Sc. cerevisiae* L50B transformants, respectively, were selected on SC^{-Ura} plates at 30°C for 2–4 days. In order to express and secrete EntL50A and EntL50B simultaneously, the recombinant plasmid pYABD04 was constructed, essentially as described above for pYABD02 and pYABD03 (Fig. 4.1). Briefly, pYABD03 was used as template for PCR amplification of a 406-bp *SmaI-XbaI* (fragment α-L50B), containing *MFα1* including the α-factor 1 Kex2 signal cleavage site fused to *entL50B*, and using Alfa4-*SmaI* and L50B2-*XbaI* as specific PCR primers (Table IV.2). The fragment α-L50B was cloned downstream of fragment α-L50A into pYABD02, previously digested with *SmaI* and *XbaI*, yielding the recombinant plasmid pYABD04, which contains the fragment α-L50A-α-L50B. This recombinant plasmid was chemically transformed into *E. coli* MAX Efficiency DH5α competent cells, and the resulting transformants were confirmed by PCR amplification, plasmid isolation and digestion with *HindIII* and *XbaI*, and DNA sequencing as described above. Finally, pYABD04 was transformed into *Sc. cerevisiae* INVSc1 competent cells, generating *Sc. cerevisiae* L50AB transformants. The plasmid pYABD01, lacking the bacteriocin structural genes, was also transformed in *Sc. cerevisiae* INVSc1, and the resulting *Sc. cerevisiae* INVSc1-α strain was used as a control. Primers used for PCR amplification of fragments L50A, L50B and α-L50B were designed from the published nucleotide sequence of EntL50 (EntL50A and EntL50B) operon (Cintas *et al.*, 1998a) and plasmid pPICZαA.

The presence of pYABD02 in *Sc. cerevisiae* L50A, pYABD03 in *Sc. cerevisiae* L50B, and pYABD04 in *Sc. cerevisiae* L50AB transformants was confirmed by PCR amplification using: (i) the *entL50A* and *entL50B* specific primer pairs L50A1-*XhoI*–L50A2-*XbaI*, and L50B1-*XhoI*–L50B2-*XbaI*, respectively; and/or (ii) the pYES2 specific primer pairs pYES2-F and pYES2-R. Likewise, the presence of pYABD01 in *Sc. cerevisiae* INVSc1-α was confirmed by PCR with the specific primer pairs pYES2-F and pYES2-R. Total genomic DNA from *Sc. cerevisiae* L50A (pYABD02), *Sc.*

cerevisiae L50B (pYABD03), *Sc. cerevisiae* L50AB (pYABD04), and *Sc. cerevisiae* INVSc1- α (pYABD01) transformants was used as template for PCR amplifications. Moreover, the direct antimicrobial activity of recombinant and control yeasts was determined as described below.

In order to assess the segregational stability of pYABD01, *Sc. cerevisiae* INVSc1- α (pYABD01) transformant was grown in SC^{-Ura} broth at 30°C overnight (OD₆₀₀ of 2.0). Subsequently, the culture was transferred to YPD broth (initial inoculum of *ca.* 1×10^5 CFU/ml), and further incubated for 50 generations (seven serial culture transfers using 0.5% inocula every 24 h) to determine the plasmid stability without selective pressure during continuous exponential growth phase. At 24 h intervals, samples were removed and bacterial counting determined onto SC^{-Ura} and YPD plates.

IV.3.5. Detection and quantification of enterocins L50A and L50B heterologous production by antimicrobial and immunochemical assays

The direct antimicrobial activity of cultures from several *Sc. cerevisiae* L50A (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B (pYABD03) transformants was screened by a SPAT essentially as previously described (Cintas *et al.*, 1995; Schoeman *et al.*, 1999). Briefly, transformants were precultured both in YPD and SC^{-Ura} broth overnight (OD₆₀₀ of 2.0). Subsequently, equal amounts (20 μ l) of yeast precultures were spotted onto plates of both media supplemented with 20 g/l galactose (Merck Farma y Química S. A., Barcelona, Spain), and 10 g/l raffinose (Sigma-Aldrich) (YPGR and SCGR, respectively), and incubated at 30°C for up to 30 days. Periodically, one of the plates was overlaid with MRS soft agar previously seeded with approximately 1×10^5 CFU/ml of the indicator microorganism *P. damnosus* CECT4797, and further incubated for 16 h. After incubation, the direct antimicrobial activity was detected by the presence of growth inhibition zones of the indicator microorganism around the spotted producer strain. Likewise, the direct antimicrobial activity of cultures from several *Sc. cerevisiae* L50AB (pYABD04) transformants was screened as described above, but only on SCGR plates.

In order to determine bacteriocin production kinetics, selected *Sc. cerevisiae* L50A (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B (pYABD03) transformants, as well as *Sc. cerevisiae* L50AB (pYABD04) transformants, were precultured in YPD and SC^{-Ura} broth, or in SC^{-Ura} broth, respectively, as aforementioned. Cells were harvested by centrifugation ($5,000 \times g$ at 4°C for 10 min), washed with YPD or SC^{-Ura} (both without glucose), and resuspended to an OD₆₀₀ of 2.0 in the same medium supplemented with 20 g/l galactose (Merck), and 10 g/l raffinose (Sigma-Aldrich) (YPGR and SCGR, respectively). These recombinant yeasts were grown in YPGR and SCGR broth, or in SCGR broth, at 30°C for eight days. Yeast growth (OD₆₀₀), CDW, and bacteriocin activity and concentration were determined periodically by duplicate. Cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation ($12,000 \times g$ at 4°C for 10 min), pH-adjustment to 6.2 with 1 M NaOH, and filter-sterilization through 0.22 μ m-pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Subsequently, aliquots of the supernatants were lyophilized and further dissolved to 1/20 of their original volume in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0). For determination and quantification of bacteriocin activity, supernatants and 20-fold

concentrated supernatants (CS) were analyzed by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.*, 1995; Basanta *et al.*, 2008a), and a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000d; Basanta *et al.*, 2008a), respectively, using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. One bacteriocin unit (BU) was defined as the highest dilution of the supernatant causing 50% growth inhibition of the indicator microorganism. Cultures and supernatants from the *Sc. cerevisiae* INVSc1- α (pYABD01) transformants, lacking the bacteriocin structural genes, were used as negative controls in the antimicrobial assays described above.

For quantification of EntL50A and EntL50B heterologous production in the supernatants of the recombinant yeast, an NCI-ELISA using rabbit polyclonal antibodies with specificity for EntL50A (anti-LR1-KLH), and EntL50B (anti-LR2-KLH) (Criado *et al.*, 2006b) was performed essentially as previously described (Gutiérrez *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b). Briefly, wells of flat-bottom polystyrene microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with culture supernatants of selected *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), and *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) transformants. After this and each subsequent step, the coated plates were washed nine times with 0.05% (vol/vol) Tween 20 (Sigma-Aldrich) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) (Merck). To reduce nonspecific binding, the wells were blocked with 300 μ l of 1% (wt/vol) ovalbumin (OA) (grade III and fraction VII) (Sigma-Aldrich) in PBS (OA-PBS) at 37°C for 1 h. Next, 50 μ l diluted anti-LR1-KLH and/or anti-LR2-KLH serums were added to each well and incubated at 37°C for 1 h. Goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) peroxidase-labeled conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, PA) was diluted 1:500 in OA-PBS, and 100 μ l was added to each well. The plates were incubated at 37°C for 30 min. Next, 100 μ l of 2,2-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS) (Sigma-Aldrich) solution with 0.066% (vol/vol) H₂O₂ was added and the plates were incubated at room temperature in the dark, after which the reaction was stopped by addition of 45.7 mM citric acid plus 0.1% (wt/vol) sodium azide. The amount of bound peroxidase was determined by measuring the absorbance at 405 nm in a Labsystems iEMS reader MF (Labsystems, Helsinki, Finland) with a built-in software package for data analysis. The ELISA plates included control wells coated with (i) 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) (coating buffer [CB])-MRS, CB-YPGR and CB-SCGR broth to set the background level of the plates; and (ii) six twofold dilutions of samples containing known concentrations of pure EntL50A and EntL50B (determined from the A_{280} using the molar extinction coefficient) in CB-MRS, CB-YPGR and CB-SCGR broth to set a standard curve within each plate. In the immunochemical assays described above, supernatants from *Sc. cerevisiae* INVSc1- α (pYABD01), lacking the bacteriocin structural genes, were used as negative controls.

To measure the synergistic activity of heterologously produced EntL50A and EntL50B, supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) strains were challenged against *P. damnosus* CECT4797, separately and combined to achieve a 1:1 bacteriocin ratio, by a SPAT and an MPA.

IV.3.6. Heterologous co-production of enterocins L50A and L50B by co-culture of recombinant yeasts

Sc. cerevisiae L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) cells were precultured independently in SC^{-Ura} broth as aforementioned. Cells were harvested by centrifugation ($5,000 \times g$ at 4°C for 10 min), washed with SC^{-Ura} (without glucose), resuspended to an OD₆₀₀ of 2.0, mixed in a 1:1 ratio, in SCGR broth and incubated at 30°C for eight days. Yeast growth (OD₆₀₀), bacteriocin activity by an ADT and an MPA, and enterocin concentration by an NCI-ELISA were determined periodically by duplicate as described above.

IV.3.7. Purification and mass spectrometry analysis of recombinant enterocins L50A and L50B

EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, were purified essentially as previously described by Cintas *et al.* (1995). Briefly, yeast precultures, grown in SC^{-Ura} broth at 30°C, were inoculated in 1-liter SCGR broth, which were further grown at 30°C with shaking until maximum EntL50A and EntL50B concentrations were achieved (*ca.*, 144 and 120 h, respectively). After removing the cells by centrifugation ($12,000 \times g$ at 4°C for 30 min), the cell-free supernatants were subjected to precipitation with ammonium sulfate (50%, wt/vol) (Merck), and subsequently desalted by gel filtration (PD-10 columns). The obtained fractions were further subjected to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow) and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by reversed-phase chromatography (PepRPC HR 5/5) in a fast-protein liquid chromatography system (FPLC) (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). The antimicrobial activity of the fractions obtained during the purification procedure was determined by an MPA, using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. Fractions displaying a high and specific bacteriocin activity were pulled together and rechromatographed on the same reversed-phase column until chromatographically pure bacteriocins were obtained. EntL50A and EntL50B concentrations in the supernatants and the final fractions obtained at the end of the purification procedure were determined by the NCI-ELISA described above. The purified recombinant bacteriocins were stored in 2-propanol (Merck) containing 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid (TFA) (Merck) at -20°C. Furthermore, purified EntL50A and EntL50B were subjected to mass spectrum analysis by using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Voyager-DE STR mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (PerSeptive Biosystems, Foster City, Calif.) at the Mass Spectrum Service of the Centro de Genómica y Proteómica (Madrid, Spain).

IV.3.8. Tricine-SDS-PAGE, Western blotting, and gel overlay assay

FPLC-purified EntL50A and EntL50B were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 16% (wt/vol) Tricine gels (Tricine-SDS-PAGE) (Schägger and von Jagow, 1987) after silver staining. The technique was performed in a XCell SureLock mini Cell, at 100 V constant current during 2 h, and monitored by the use of a SeeBlue Pre-Stained Standard molecular

mass markers (Invitrogen). Further treatment of the gel included the immersion, during six min with agitation, in distilled water solutions of: (i) acetic acid (5%, vol/vol), methanol (50%, vol/vol) and calcium chloride (2%, vol/vol); (ii) ethanol (10%, vol/vol) and acetic acid (5%, vol/vol); (iii) potassium permanganate (0.01%, wt/vol); (iv) ethanol (10%, vol/vol) and acetic acid (5%, vol/vol); (v) ethanol (10%, vol/vol); and (vi) silver nitrate (0.1%, wt/vol). Then, the gel was washed in distilled water during 30 seconds and immersed in a solution of potassium carbonate (2%, wt/vol) in distilled water during 90 seconds. Subsequently, EntL50A and EntL50B were detected by gel incubation in solutions in distilled water of potassium carbonate (2%, wt/vol) and 10 µl formaldehyd, and ethanol (10%, vol/vol) and acetic acid (5%, vol/vol). Western blotting using anti-LR1-KLH (specific for EntL50A) and anti-LR2-KLH (specific for EntL50B) antibodies was performed essentially as previously described (Gutiérrez *et al.*, 2004). Briefly, the electrophoresed gel was immersed in blotting buffer (0.582% [wt/vol] trizma base, Sigma-Aldrich; 0.293% [wt/vol] glycine, Sigma Aldrich; 20% [vol/vol] methanol, Merck) during 10 min before covering with the nitrocellulose membrane that had been previously immersed in methanol and blotting buffer. Three sheets of Whatman 3M paper were placed under the gel and above the nitrocellulose membrane. The blotting was performed by application of a constant current of 10 V for 47 min. The transfer of the peptides from the gel to the membrane was monitored by the use of the SeeBlue Pre-Stained Standard molecular mass marker (Invitrogen). Further treatment of the blotted membrane included blocking in 50 ml of skim milk (5% [wt/vol] skim milk powder in PBS) at 37°C for 1 h, and further incubation with 30 ml of the anti-LR1-KLH and/or anti-LR2-KLH sera (diluted 1:5,000 in PBS) for 1 h at 37°C. Incubation of conjugate (diluted 1:12,500 in defatted milk powder) permitted visualization of the expected antigen-antibody interactions by chemiluminescence with the ECL Western-blotting Detection Reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Barcelona, Spain). The light emissions was detected by a Labsystems iEMS reader (Labsystems, Helsinki, Finland) with a built-in software package. To determine the antimicrobial activity of the purified heterologously produced EntL50A and EntL50B, a gel overlay assay (Bhunia *et al.*, 1987) was performed using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. Briefly, the electrophoresed gel was fixed in a solution of 20% (vol/vol) 2-propanol and 10% (vol/vol) acetic acid in distilled water and further washed during 1, 16, and 1 h in distilled water. The first 1 h washing was performed at room temperature with agitation, while the other two washings were carried out at 4°C without agitation. After the gel was fixed, washed, and drained, it was overlaid with the indicator strain *P. damnosus* CECT4797 at 1×10^5 CFU/ml in MRS soft agar (0.8%, wt/vol) and incubated at 30°C for 16 h.

IV.4. RESULTS

IV.4.1. Construction of the *Saccharomyces cerevisiae* protein expression and secretion vector pYABD01, and cloning of *entL50A* and *entL50B* separately and together

The *Sc. cerevisiae* protein expression and secretion vector pYABD01 (6,101 bp) was constructed as outlined in Fig. 4.1 *MFαI_s* was PCR-amplified from the *Pc. pastoris* expression and secretion vector

pPICZ α A, and successfully inserted into the *Sc. cerevisiae* protein expression vector pYES2 under control of the GAL1 gene promoter (P_{GAL1}) and enhancer sequences for high level inducible protein expression in *Sc. cerevisiae* by galactose and repression by glucose. The generated high-copy number *Sc. cerevisiae* expression-secretion vector pYABD01 was designed to contain a 339-bp *Hind*III-*Xba*I fragment harbouring the Kozak translation initiation sequence (ACGATGA), and *MF α I*_s including the Kex2 signal cleavage site (Glu-Lys-Arg) required for processing of the fusion protein during secretion. The correct construction of pYABD01 was verified by PCR amplification, plasmid isolation and subsequent digestion with *Hind*III and *Xba*I, as well as DNA sequencing (results not shown). Interestingly, the high-copy number pYABD01 vector was maintained by approximately 100% of the cells over at least 50 generations in the absence of selective pressure. Subsequently, *entL50A* and *entL50B* were cloned, separately and together, in pYABD01 (Fig. 4.1). For this purpose, the 164-bp *Xho*I-*Xba*I and 148-bp *Xho*I-*Xba*I cleaved fragments L50A and L50B, carrying the α -factor 1 Kex2 signal cleavage site fused in frame to *entL50A* and *entL50B*, respectively, were first cloned separately into plasmid pYABD01 resulting in the recombinant plasmids pYABD02 and pYABD03, intended for the expression of each native bacteriocin structural genes without additional amino acids at their N-termini (Fig. 4.1). The correct construction of pYABD02 and pYABD03 was verified by PCR amplification, plasmid isolation and subsequent digestion with *Xho*I and *Xba*I, as well as DNA sequencing (results not shown). By using a similar approach, the recombinant plasmid pYABD04 was constructed for expression and secretion of *entL50A* and *entL50B* together. A 406-bp *Sma*I-*Xba*I cleaved fragment α -L50B, carrying *MF α I*_s including the Kex2 signal cleavage site fused in frame to *entL50B*, was cloned downstream of fragment α -L50A into plasmid pYABD02 resulting in the recombinant plasmid pYABD04, intended for high level inducible expression of both native bacteriocin structural genes under control of P_{GAL1} without additional amino acids at their N-termini (Fig. 4.1). The correct construction of pYABD04 was verified as described above. The recombinant plasmids pYABD01, pYABD02, pYABD03 and pYABD04 were chemically transformed in *Sc. cerevisiae* INVSc1 (*Ura3* genotype) competent cells, and transformants selected on SC^{-Ura} plates. The presence of these recombinant plasmids in *Sc. cerevisiae* strains was confirmed by PCR (results not shown).

IV.4.2. Heterologous expression and secretion of biologically active enterocins L50A and L50B by *Saccharomyces cerevisiae*

The heterologous production of EntL50A and EntL50B by transformant yeasts was detected and quantified by both antimicrobial and immunochemical assays. The antimicrobial assays used for screening of biologically active enterocin molecules included a SPAT to detect the direct antimicrobial activity of the transformant cultures as well as an ADT and an MPA to detect and quantify, respectively, the antimicrobial activity in supernatants and CS from the recombinant yeast cultures. For these purposes, several *Sc. cerevisiae* L50A (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B (pYABD03) transformants were selected and precultured in YPD and SC^{-Ura} broth at 30°C. Then, yeast precultures

were spotted onto YPGR and SCGR plates and grown at 30°C for up to 30 days to test in daily intervals their direct antimicrobial activity by a SPAT against *P. damnosus* CECT4797 (EntL50^s) (Basanta *et al.*, 2008a), but no detectable activity attributable to EntL50A and/or EntL50B was detected. In spite of that, the transformants were further grown in YPGR and SCGR broth at 30°C for eight days, and supernatants were periodically withdrawn, and the corresponding CS obtained, to test their antimicrobial activity by an ADT and an MPA against the same indicator microorganism. By using both assays, extracellular antimicrobial activity of *Sc. cerevisiae* L50A (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B (pYABD03) transformants grown in SCGR and/or YPGR was detected (Fig. 4.2; Table IV.3). It is pertinent to note that no antimicrobial activity was found in supernatants and CS from *Sc. cerevisiae* INVSc1- α , transformed with the plasmid pYABD01 lacking the bacteriocin structural genes, grown in YPGR or SCGR broth (Fig. 4.2). This result ruled out the possibility that the extracellular antimicrobial activity exerted by *Sc. cerevisiae* L50A (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B (pYABD03) transformants could be caused by metabolites other than bacteriocins. The *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) transformants were selected for further microbiological and immunochemical quantification of recombinant EntL50A and EntL50B production, respectively, in SCGR and YPGR (Fig. 4.2; Table IV.3). The antimicrobial activity of supernatants and CS from cultures of *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) grown in SCGR was first detected at 72 and 24 h of incubation, respectively, and maximum antimicrobial activity was found after incubation for 144 h (170 and 11,600 BU/ml, respectively) (Fig. 4.2, panels A and B, respectively; Table IV.3). In the same medium, the antimicrobial activity of CS from *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) was first detected at 24 h of incubation, and the maximum antimicrobial activity was found after incubation for 120 h (7,500 BU/ml). Likewise, considering the CDW, the maximum antimicrobial activity of CS from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) was also found after incubation for 144 h (255 BU/mgCDW) and 120 h (165 BU/mgCDW), respectively. The heterologous production of EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, was further quantified using specific anti-LR1-KLH (specific for EntL50A), and anti-LR2-KLH (specific for EntL50B) antibodies in an NCI-ELISA. By using this immunochemical approach, the presence of the recombinant bacteriocins in supernatants from the corresponding transformants and their absence in equivalent samples from the negative control strain *Sc. cerevisiae* INVSc1- α (pYABD01) was clearly shown. The production of EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, started immediately after induction of gene expression with galactose, was parallel to cell growth, and the bacteriocins reached their maximum concentrations at the beginning of the stationary phase or the late stage of the exponential growth phase, respectively (Table IV.3). In this respect, the maximum concentration of EntL50A (19.3 ng/ml) and EntL50B (52.5 ng/ml) in supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) was detected at 144 and 120 h of incubation, respectively. Besides, considering the CDW, the maximum amount of EntL50A and EntL50B in the yeast cultures was 8.4 and 24.0 ng/mgCDW, respectively. It is interesting to note that the maximum specific activity of EntL50A in CS from *Sc.*

Table IV.3. Production and antimicrobial activity of recombinant EntL50A and EntL50B from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) cultures, respectively, grown in the minimal medium SCGR at 30°C

<i>Sc. cerevisiae</i> L50A-20 (pYABD02)									<i>Sc. cerevisiae</i> L50B-4 (pYABD03)								
Time (h)	OD ₆₀₀ ^a	EntL50A concn ^b		Antimicrobial activity				SAA ^c (BU/ng EntL50A)	OD ₆₀₀	EntL50B concn ^b		Antimicrobial activity				SAA ^c (BU/ng EntL50B)	
				ADT ^c (mm)		MPA ^d						ADT (mm)		MPA			
		ng/ml	ng/mgCDW	S	CS	BU/ml	BU/mg CDW			S	CS	BU/ml	BU/mg CDW				
0	2.0	NB	NB	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	2.0	NB	NB	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	
2	2.0	0.7	0.4	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	2.0	0.3	0.2	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	
8	2.1	1.5	0.9	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	2.0	7.2	4.2	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	
12	2.5	1.6	0.9	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	2.1	9.8	5.7	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	
18	3.4	1.7	0.9	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	2.5	13.4	7.4	NIZD	NIZD	NID	NID	NE	
24	4.4	4.6	2.1	NIZD	12.4 n2	650	15	7	3.9	17.8	8.4	NIZD	11.1 n2	600	15	1.8	
36	4.5	4.8	2.2	NIZD	16.3 n2	900	20	9	4.3	24.4	11.1	NIZD	13.2 n2	1,400	30	2.7	
48	4.6	5.0	2.3	NIZD	16.5 n2	1,900	45	20	4.3	37.5	17.1	NIZD	13.4 n2	1,900	45	2.6	
72	4.6	8.0	3.3	8.2 n	16.7 n2	2,100	50	14	4.4	44.5	20.0	NIZD	13.7 n2	3,200	70	3.5	
96	4.9	7.6	3.6	8.2 n	16.7 n2	3,500	75	23	4.4	52.2	24.0	NIZD	13.9 n2	4,800	110	4.6	
120	4.9	14.4	6.3	9.5 n	18.1 n2	4,900	110	17	4.5	52.5	23.4	NIZD	16.1 n2	7,500	165	7.1	
144	5.0	19.3	8.4	10.4 n	18.9 n2	11,600	255	30	4.7	51.0	22.4	NIZD	15.2 n2	3,500	75	3.3	
168	5.0	14.4	6.3	10.3 n	18.6 n2	8,000	175	28	4.8	42.3	18.4	NIZD	14.7 n2	3,700	80	4.3	
192	5.1	10.9	4.7	9.0 n	17.8 n2	6,000	130	28	4.8	40.5	17.6	NIZD	14.1 n2	2,700	60	3.4	

^aOD₆₀₀, optical density of the culture at 600 nm.^bEntL50A and EntL50B concentration calculated by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for EntL50A or EntL50B, and expressed as ng/ml and ng/mgCDW. NB, no bacteriocin detected.^cAntimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 as determined by an ADT. Inhibition zones are differentiated as follows: n= nitide, n2= extremely nitide. NIZD, no inhibition zone detected using 50 µl of supernatant (S) or 20-fold concentrated supernatant (CS).^dAntimicrobial activity of CS against *P. damnosus* CECT4797 as determined by an MPA. NID, no inhibition detected using 100 µl of CS.^eSpecific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity of CS (BU/mgCDW), calculated by an MPA, divided by EntL50A or EntL50B concentration (ng/mgCDW). NE, not evaluable.

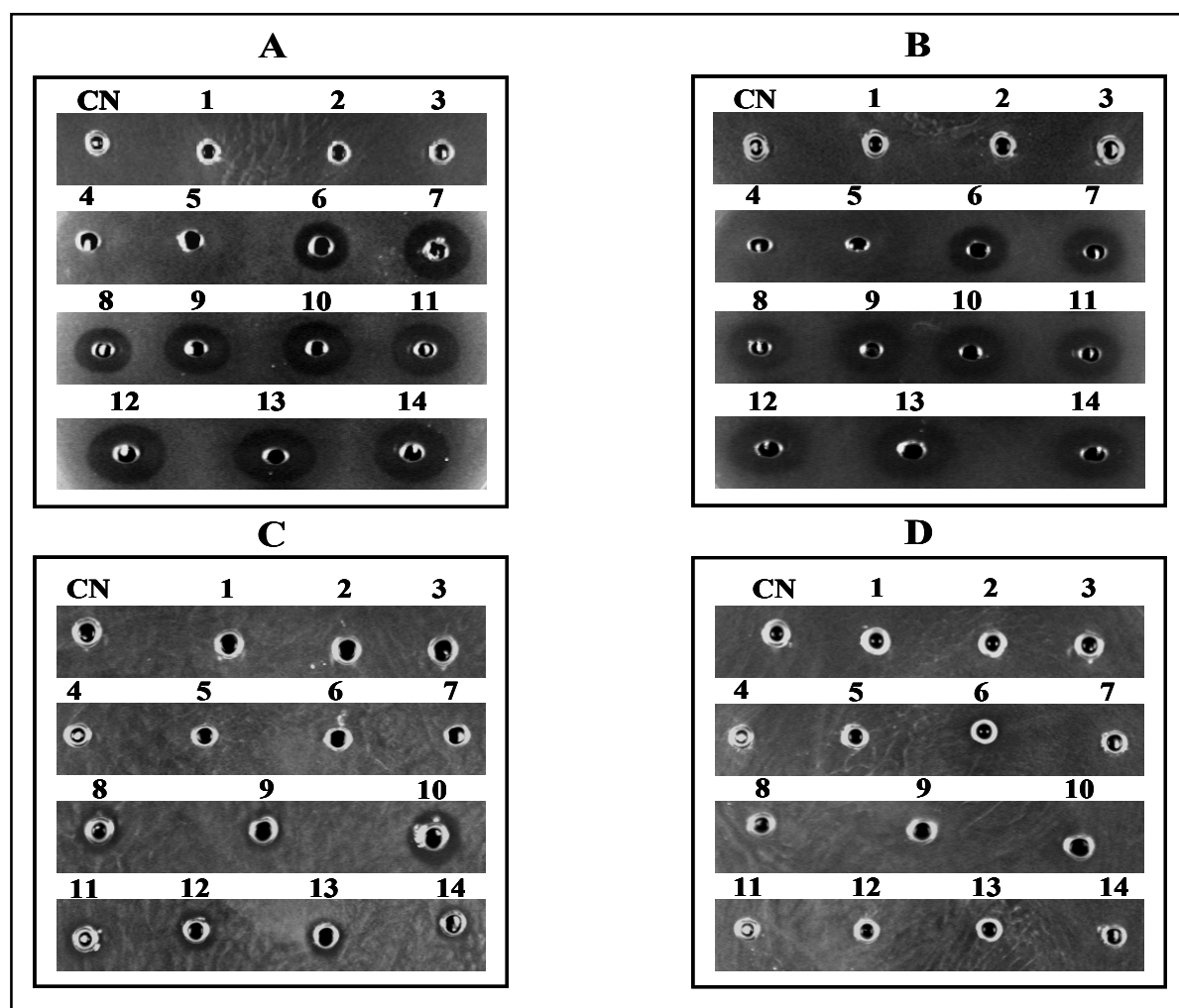


Figura 4.2. Antimicrobial activity of CS from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) cultures grown in SCGR (A and B, respectively) and YPGR (C and D, respectively) broth at 30°C (CS) against *P. damnosus* CECT4797 by an ADT. CS were obtained after incubation of cultures for 0 (1), 2 (2), 8 (3), 12 (4), 18 (5), 24 (6), 36 (7), 48 (8), 72 (9), 96 (10), 120 (11), 144 (12), 168 (13), and 192 (14) h. CS from *Sc. cerevisiae* INVSc1- α (pYABD01) cultures grown in SCGR and YPGR broth at 30°C for 192 h (CN) were used as negative control.

cerevisiae L50A-20 (pYABD02) was 30 BU/ngEntL50A, while that of EntL50B in CS from *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) was only 7.1 BU/ngEntL50B.

On the other hand, *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) grew much faster and a higher cell density was reached in the complex medium YPGR (OD_{600} of 8.5 compared to OD_{600} of 4.8–5.1 in SCGR) (results not shown). However, the extracellular antimicrobial activity of *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) was only detected in CS assayed by the ADT, and no antimicrobial activity was detected neither in supernatants nor CS from *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (Fig. 4.2, panels C and D, respectively). Interestingly, both antimicrobial activity and production of EntL50A by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) started 48 h after induction of gene expression with galactose, corresponding to the early stationary phase of growth in YPGR, and reached the maximum values after incubation for 96 h. In this respect, the

maximum antimicrobial activity (diameter of the inhibition zone of 9.3 mm) and EntL50A concentration (15.0 ng/ml or 5.2 ng/mgCDW) were lower than that obtained in SCGR (Table IV.3). Surprisingly, although supernatants and CS from *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) grown in YPGR did not exert antimicrobial activity, production of EntL50B was detected at 48 h, and reached its maximum value, lower than that in SCGR, after incubation for 6 days (56.3 ng/ml or 19.1 ng/mgCDW). Moreover, it is interesting to note that similar EntL50A and EntL50B concentrations in supernatants from cultures grown in SCGR (3.6–6.3 and 17.1–20.0 ng/mgCDW, respectively) produced bigger inhibition zones (diameter of 16.7–18.1 and 13.4–13.7 mm, respectively) (Table IV.3).

To investigate the feasibility of the simultaneous production of EntL50A and EntL50B by a single yeast strain, *Sc. cerevisiae* L50AB (pYABD04) transformants were obtained. Similarly as shown for *Sc. cerevisiae* L50A (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B (pYABD03) transformants, no detectable direct antimicrobial activity attributable to EntL50A and/or EntL50B was detected in cultures of *Sc. cerevisiae* L50AB (pYABD04) transformants grown in SCGR. However, bacteriocin production was detected and quantified in the corresponding supernatants by both the antimicrobial and immunochemical assays described above. The maximum antimicrobial activity of supernatants and CS from *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) was found after incubation for 144 h (200 and 13,800 BU/ml, respectively). Likewise, considering the CDW, the maximum antimicrobial activity of supernatants and CS from this recombinant strain was also found after incubation for 144 h (87 and 300 BU/mgCDW, respectively). EntL50A was maximally accumulated in supernatants from *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) at 24 ng/ml (10.4 ng/mgCDW), but, surprisingly, no EntL50B production was detected. It is interesting to note that the specific activity of EntL50A in CS from *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) was 29 BU/ngEntL50A.

In order to determine whether both EntL50A and EntL50B could be produced in a same culture, *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) were co-cultured in SCGR broth, and heterologous bacteriocin production was detected and quantified by the antimicrobial and immunochemical assays described above. Although yeast growth was similar to that obtained when both yeast strains were grown independently, antimicrobial activity of supernatants from the co-culture was higher (Fig. 4.3). In this respect, the maximum antimicrobial activity was found after incubation for 96 h and was as high as 360 BU/ml (170 BU/mgCDW), and the maximum concentration of EntL50A (10.3 ng/ml or 4.7 ng/mgCDW) and EntL50B (55.3 ng/ml or 25.8 ng/mgCDW) was detected at 96 and 120 h of incubation, respectively.

It should be noted that the concentration of EntL50B at 96 h was 21.7 ng/mgCDW. Interestingly, the independent antimicrobial activity of approximately these amounts of EntL50A (3.6–6.3 ng/mgCDW) and EntL50B (20–24 ng/mgCDW) found in supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, was determined as 70–110 BU/mgCDW. These results demonstrated the production of EntL50A and EntL50B by the co-culture and suggested that both recombinant bacteriocins act synergistically. To further confirm

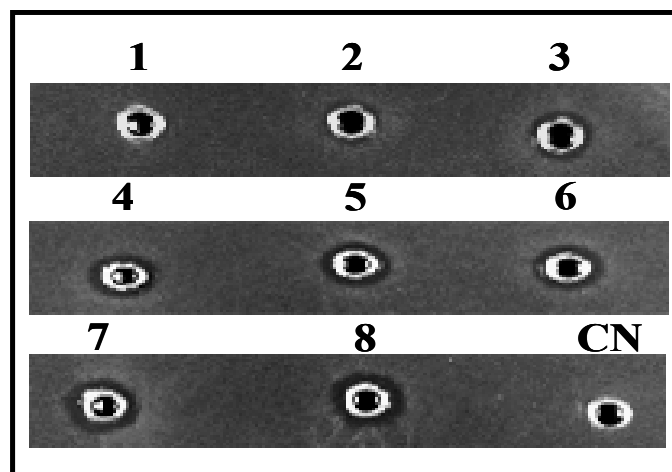


Figure 4.3. Antimicrobial activity of supernatants from a co-culture of *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) grown in SCGR broth at 30°C against *P. damnosus* CECT4797 by an ADT. Supernatants were obtained after incubation of cultures for 0 (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4), 96 (5), 120 (6), 144 (7) and 168 (8) h. Supernatant from a *Sc. cerevisiae* INVSc1- α (pYABD01) culture grown in SCGR broth at 30°C for 168 h (CN) was used as negative control.

4 (pYABD03) cultures with known bacteriocin concentrations were challenged against *P. damnosus* CECT4797, independently and mixed in a 1:1 bacteriocin ratio, by an SPAT (Fig. 4.4) and an MPA. The recombinant EntL50A and EntL50B together possess a greater antimicrobial activity (133 BU/mgCDW) than that exerted by both peptides acting independently (53 and 23 BU/mgCDW, respectively), and the synergism degree was quantified as *ca.* 1.8-fold.

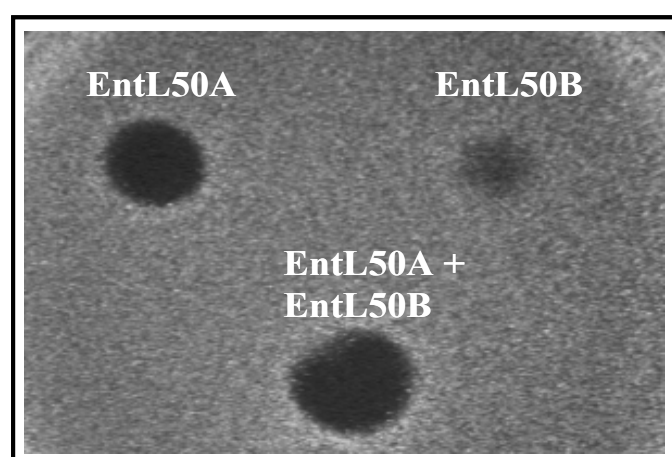


Figure 4.4. Antimicrobial activity of supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (EntL50A) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (EntL50B) cultures grown in SCGR broth at 30°C, independently and combined to achieve a 1:1 bacteriocin ratio (EntL50A+EntL50B), against *P. damnosus* CECT4797 as determined by a SPAT.

IV.4.3. Purification and characterization of enterocins L50A and L50B heterologously produced by *Saccharomyces cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively

In order to achieve maximum production of recombinant bacteriocins, *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) were precultured in SC^{-Ura} broth at 30°C, and subsequently grown in 1-liter SCGR broth at 30°C until maximum EntL50A and EntL50B concentrations were achieved according to data shown in Table IV.3 (*ca.*, 144 and 120 h, respectively). Ammonium sulfate precipitation of proteins in culture supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) allowed an increase in specific antimicrobial activity of 12- and 21-fold, and a recovery of 11 and 22% of the bacteriocin activity originally present in culture supernatants, respectively (Table IV.4). In a first approach, we followed the chromatographic procedure previously described for bacteriocin purification from culture supernatants from the natural EntL50 (EntL50A and EntL50B) producer strain *E. faecium* L50 grown in MRS broth (Cintas *et al.*, 1995). Thus, fractions from ammonium sulfate precipitation were subjected to cation-exchange chromatography; however, this strategy was unsuccessful since recombinant EntL50A and EntL50B, contrarily to natural EntL50 (EntL50A and EntL50B), did not bound to the cation exchanger matrix (results not shown). To cope with this inconvenient, fractions resulting from ammonium sulfate precipitation from a new purification process were desalted by gel filtration prior to cation-exchange chromatography. However, the antimicrobial activity of the fraction containing EntL50A was only a 0.8% of that initially present in the culture supernatant, and the fraction containing EntL50B showed no antimicrobial activity (Table IV.4). Strikingly, the fractions eluted from the hydrophobic-interaction columns showed a recovery of 10 and 5.9% of the initial EntL50A and EntL50B antimicrobial activity, respectively, and a 2,958- and 300-fold increase in specific antimicrobial activity, respectively. The last reversed-phase FPLC purification step resulted, in both cases, in a major absorbance peak coincident with the antimicrobial activity peak (results not shown). Recombinant EntL50A and EntL50B eluted at 27 and 29% (vol/vol) 2-propanol in aqueous 0.1% (vol/vol) TFA, respectively, and their final specific activity was 452- and 2,000-fold greater than that of culture supernatants. Strikingly, although the antimicrobial activity in these fractions only represented a recovery of 1.3 and 2.6% of the EntL50A and EntL50B original activity, respectively, the corresponding amount of recombinant EntL50A and EntL50B was determined by an NCI-ELISA to be as high as 8.6 and 23.5 µg, which represents a 46.5 and 45.8% of the bacteriocin amount originally found in culture supernatants, respectively. The purity and molecular mass of recombinant EntL50A and EntL50B in fractions from the last reversed-phase FPLC was further evaluated by MALDI-TOF MS. The results obtained for recombinant EntL50A revealed three major peptides with molecular masses ranging from 6.2 to 6.4 kDa (Fig. 4.5.A), while those for recombinant EntL50B showed two major peptides with molecular masses (*ca.*, 5,242 and 5,226 Da) closely similar to that of natural EntL50B (5,178 Da), as well as a minor peptide with the expected molecular mass (5,179 Da) (Fig. 4.5.B).

Table IV.4. Purification of recombinant EntL50A and EntL50B produced by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, grown in SCGR at 30°C

Purification stage	Volume (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity (BU) ^b	Sp act (BU/ A_{254}) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Total activity (%)	Enterocin yield (ng) ^e	Enterocin yield (%)	Enterocin sp act (BU/ng) ^f
<i>Sc. cerevisiae</i> L50A-20 (pYABD02)									
Culture supernatant	1000	24,580	142,100	6	1	100	18,500	100	7.7
Ammonium sulfate precipitation	100	221	15,700	71	12	11	ND	ND	ND
Gel filtration chromatography	200	37.4	12,800	342	57	9	ND	ND	ND
Cation-exchange chromatography	50	3.9	1,100	282	47	0.8	ND	ND	ND
Hydrophobic-interaction chromatography	10	0.8	14,200	17,750	2,958	10	ND	ND	ND
Reversed-phase chromatography	2.6	0.7	1,900	2,714	452	1.3	8,600	46.5	0.2
<i>Sc. cerevisiae</i> L50B-4 (pYBAD03)									
Culture supernatant	1000	14,400	46,000	3	1	100	51,300	100	0.9
Ammonium sulfate precipitation	100	157	10,000	64	21	22	ND	ND	ND
Gel filtration chromatography	200	29.6	6,400	216	72	14	ND	ND	ND
Cation-exchange chromatography	50	0.5	0	0	0	0	ND	ND	ND
Hydrophobic-interaction chromatography	10	3.0	2,700	900	300	5.9	ND	ND	ND
Reversed-phase chromatography	1.9	0.2	1,200	6,000	2,000	2.6	23,500	45.8	0.05

^aAbsorbance at 254 nm multiplied by the volume in milliliters.

^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) as determined by an MPA multiplied by the total volume.

^cSpecific activity expressed as the total activity (BU) divided by the total A_{254} .

^dThe specific activity of a fraction (BU/ A_{254}) divided by the specific activity of the culture supernatant (BU/ A_{254}).

^eEntL50A and EntL50B concentration as determined by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for EntL50A or EntL50B. ND, not determined.

^fSpecific activity expressed as the total activity (BU) divided by the enterocin yield (ng).

Recombinant EntL50A and EntL50B were also analyzed on silver-stained Tricine-SDS-PAGE gels (Fig. 4.6.A), resulting in one major band of the expected size in the gel slots containing EntL50A or EntL50B, as well as two and one upper bands, respectively, thus suggesting that both recombinant bacteriocin peptides display a strong tendency to form aggregates. The peptides and peptide aggregates were also detected by Western blotting using the anti-LR1-KLH and anti-LR2-KLH antibodies specific for EntL50A and EntL50B, respectively (Fig. 4.6.B), and they were shown to be biologically active by an overlay assay (Fig. 4.6.C).

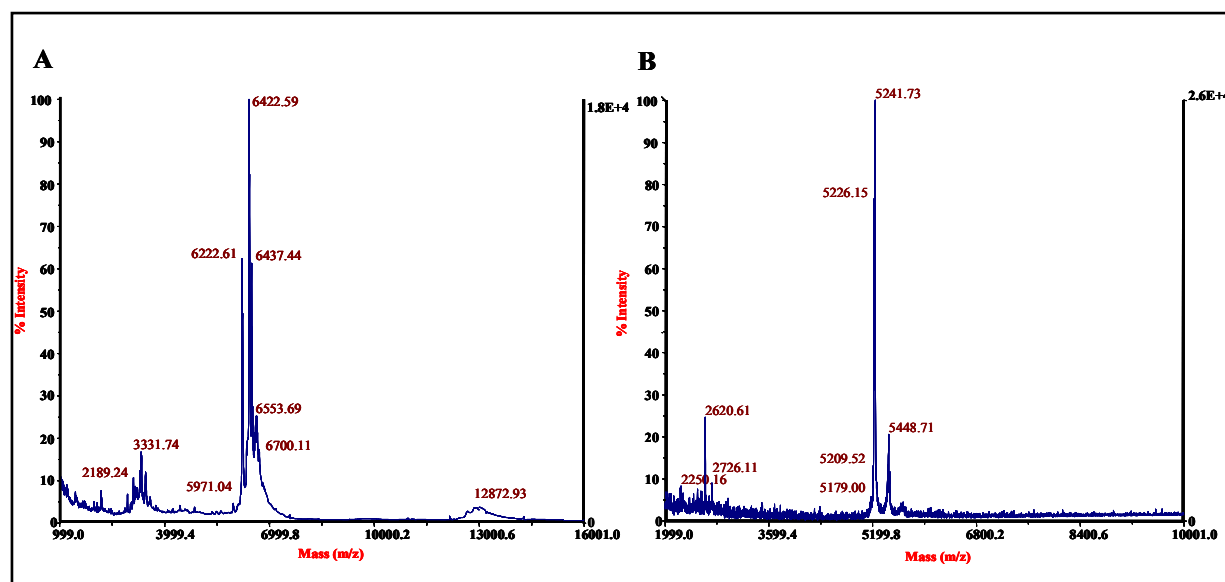


Figure 4.5. Mass spectrometry analysis of recombinant EntL50A (A) and EntL50B (B) purified from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) cultures, respectively, grown in SCGR broth at 30°C.

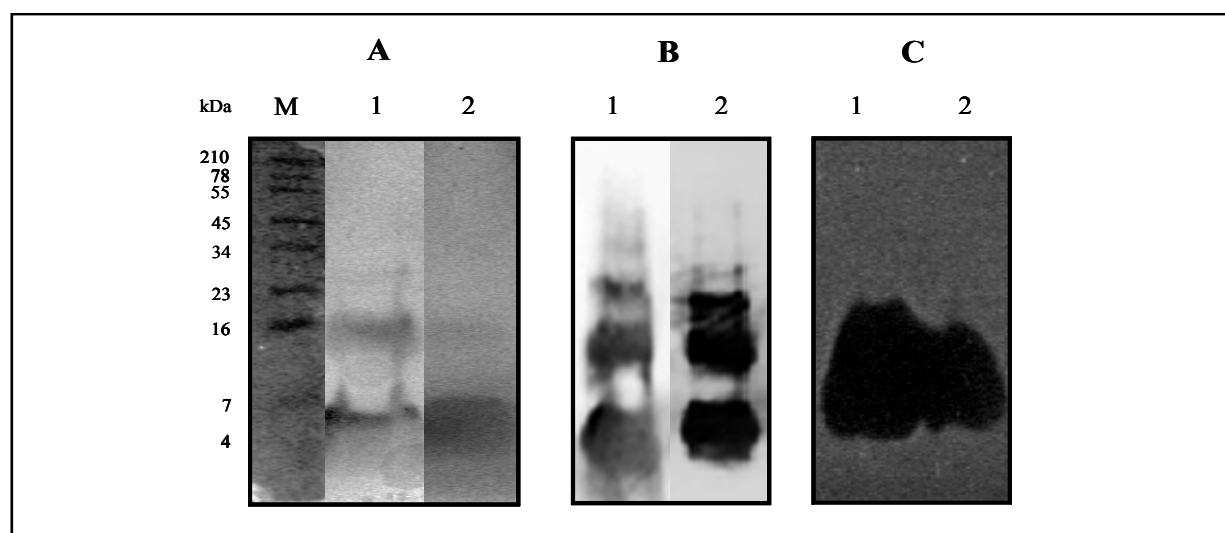


Figure 4.6. (A) Tricine-SDS-PAGE of purified EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, after silver staining. (B) Western blotting using rabbit polyclonal antibodies with specificity for EntL50A (anti-LR1-KLH) and EntL50B (anti-LR2-KLH). (C) Antimicrobial activity after gel overlay with the indicator strain *P. damnosus* CECT4797. Lane 1, purified EntL50A; lane 2, purified EntL50B. The positions of SeeBlue Pre-Stained Standard molecular mass markers (M) (Invitrogen) are indicated on the left.

IV.5. DISCUSSION

To our best knowledge, the present work reports for the first time the heterologous expression and secretion of a non pediocin-like bacteriocin, EntL50 (EntL50A and EntL50B), by yeasts. A number of different signal peptides have been employed to direct the secretion of foreign proteins by *Sc. cerevisiae*, being that of the precursor of the yeast 13-residue peptide mating pheromone α -factor 1 (MF α 1_s) the most commonly used for heterologous secretion of proteins with sizes ranging from 24 to 842 amino acid residues (Brake, 1990; Schuster *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). In general, soluble proteins lacking potential N-glycosilation sites may be highly over-expressed and efficiently secreted as homogeneous products if fused to MF α 1_s; however, secretion may be inhibited in proteins containing hydrophobic regions (*i.e.*, signal sequences or transmembrane domains) (Schuster *et al.*, 2000). In this work, we have constructed a high-copy number and segregationally stable *Sc. cerevisiae* protein expression and secretion vector, pYABD01 (6,101 bp), derived from the 2 μ -episomal plasmid pYES2, and containing the P_{GAL1} promoter for high level inducible protein expression by galactose and repression by glucose, as well as MF α 1_s including the Kex2 signal cleavage site required for processing of fusion proteins during Sec-dependent secretion. This recombinant vector system was successfully used for the generation of three recombinant plasmids intended to the heterologous production of EntL50A and EntL50B, independently and together, by *Sc. cerevisiae*. The generated recombinant strains *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), and *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) did not exert bacteriocinogenic activity in solid media (SCGR and/or YPGR plates). It is possible to speculate that this phenomenon may be due to a low bacteriocin production and/or to bacteriocin sticking or adsorption to the bacteriocin-producer cells as proposed for other heterologous systems (see below). However, the corresponding culture supernatants showed antimicrobial activity, and bacteriocin production was detected and quantified by antimicrobial and immunochemical assays. Notwithstanding the yeast growth was higher in YPGR broth than in SCGR broth, the extracellular antimicrobial activity was much lower in the former medium, and the recombinant EntL50A and EntL50B production represented a 62 and 80% of that found in SCGR broth, respectively. Given that pYABD01 is segregationally stable, these differences in bacteriocin extracellular concentration may not be due to plasmid instability in cells grown under non-selective conditions (*i.e.*, YPGR broth). Nevertheless, considering that EntL50A and EntL50B are cationic peptides (Cintas *et al.*, 1998a), they probably adsorb to the negatively charged producer yeast cell surface, as it has been previously shown for other bacteriocins (Klaenhammer, 1988; Ray, 1992; Yang *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 2001; von Mollendorff *et al.*, 2007). Moreover, it is known that, in general, bacteriocin adsorption to the producer cells is a pH-dependent, reversible phenomenon, being the maximum and minimum adsorption obtained at pH 6.0–7.0 and 2.0–3.0, respectively (Yang *et al.*, 1992). The final pH of *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) cultures grown in SCGR broth was lower than that in YPGR broth (pH 3,0 and pH 6,0, respectively), and thus it is plausible that the lower amounts of bacteriocins found in the later medium may be also due to a higher bacteriocin adsorption to the producer yeast cell surface. Besides, hydrophobic proteins or peptides, such as most bacteriocins, are known to interact with the producer cell membranes

(Schiffer *et al.*, 1992; Schoeman *et al.*, 1999). In this respect, EntL50A is more hydrophobic than EntL50B (GRAVY indexes of 0.202 and – 0.144, respectively) (Cintas *et al.*, 2000d), which may lead to a higher EntL50A sticking within the yeast cytoplasmic membrane after the initial pH-dependent cell-surface adsorption, and thus to a lower peptide concentration in the respective supernatants. It is pertinent to note that when comparing the antimicrobial activity of the same bacteriocin concentrations in supernatants from cultures grown in SCGR and YPGR broth, the former values were much higher. Therefore, it is unlikely that the phenomena cited above are the only factors responsible for the differences observed in the antimicrobial activity found in supernatants from cultures grown in these media. At first glance, the lower antimicrobial activity found in YPGR broth may be also partially ascribed to one or more of the following factors in this medium: (i) existence of compounds (*i.e.*, salt and/or proteins or collagen-like materials) interfering with bacteriocin activity (Schoeman *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005b; Ilgen *et al.*, 2005), (ii) (higher) aggregation of bacteriocin monomers rendering less active oligomers and/or complexes with medium constituents (Criado *et al.*, 2006b), and/or (iii) higher bacteriocin degradation due to a higher protease activity as a result of a combination of higher cell density and cell lysis yielding a higher concentration of vacuolar proteases (Brey *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005b; Criado *et al.*, 2006b). Moreover, *Sc. cerevisiae* is widely known for its ability to perform many post-translational modifications on secreted proteins such as proteolytic maturation, disulphide bond formation and addition of both *O*-linked and *N*-linked carbohydrate moieties, and as a result of the later event, heterologously secreted glycoproteins may be inactive and/or less active, as well as antigenically distinct from the natural proteins (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1990; Cereghino and Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). However, it should be noted that glycosilation sites are not found within EntL50A and EntL50B molecules, being thus unlikely that qualitative or quantitative differences in glycosilation in YPGR and SCGR may account for the differences in bacteriocin activity observed when both media.

The maximum amount of EntL50A produced by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) in SCGR and YPGR broth was approximately 3- to 4-fold lower, respectively, than that of EntL50B produced by *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) in the same media. At first glance these differences may be ascribed to higher C-terminal proteolytic degradation of EntL50A and/or secretion of EntL50B at higher levels. Respect to the latter possibility, it has been demonstrated that the efficiency of secretion depends in part on the nature characteristics of the heterologous protein (Cereghino and Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Cereghino *et al.*, 2002); however, we consider unlikely that this phenomenon is responsible for the differences in EntL50A and EntL50B concentrations found in the respective supernatants since both peptides are highly-related (72% identity), show similar physico-chemical characteristics, such as molecular weight, charge, pI and hydrophobicity, and share 31 out of 44 and 43 amino acid residues, especially at the N-terminus, including the first eight amino acid residues (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d). Moreover, it is widely known that hydrophobic proteins, such as most bacteriocins, interact with the producer cell membranes (Schiffer *et al.*, 1992; Schoeman *et al.*, 1999). In this respect, the higher hydrophobicity of EntL50A (Cintas *et al.*, 2000d) may result in a higher

sticking within the yeast cytoplasmic membrane after the initial pH-dependent cell-surface adsorption. On the contrary, EntL50A and EntL50B are produced at equimolar amounts by the wild-type bacteriocin producer *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b). In previous studies (Cintas *et al.*, 1998a; Basanta *et al.*, 2008a) we have shown that *in vitro* synthesized EntL50A and EntL50B act synergistically, being the synergistic effect higher when both peptides are mixed in a 1:1 ratio. Therefore, in this work, we further evaluated the recombinant paired production of EntL50A and EntL50B by a single *Sc. cerevisiae* strain. Similarly as *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), the recombinant strain *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) did not exert any bacteriocinogenic activity in solid media (SCGR plates); however, antimicrobial activity was found in culture supernatants. Interestingly, production of EntL50A by *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) was 24% higher than by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), but, strikingly, EntL50B was not produced. In order to confirm that the recombinant plasmid pYABD04 contained the correct nucleotide sequence, several attempts to sequence the fragment α -L50A- α -L50B were done, but, surprisingly, the sequence was blocked immediately after the last codon of *MF α I_s* fused to *entL50A*. To cope with this sequence blockage, the fragment α -L50A- α -L50B was digested with *Hind*III-*Sma*I and *Sma*I-*Xba*I to generate the fragments α -L50A and α -L50B, respectively, which were completely sequenced revealing the correct sequence. Considering these results and the high similarity between EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d), we hypothesized that DNA secondary structures may be established in the fragment α -L50A- α -L50B, and likely also in the corresponding mRNA, leading to the blockage of *entL50B* expression, at the transcriptional and/or translational level, and to a higher expression of *entL50A*. In this respect, it is known that secondary structures inhibit translational initiation in *Sc. cerevisiae* (Oliveira *et al.*, 1993; Vega-Laso *et al.*, 1993). Although the paired production of EntL50A and EntL50B by a single *Sc. cerevisiae* strain was not achieved, we succeeded in the co-production of both peptides by co-culturing *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03). These results suggested that, as further confirmed using supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (Fig. 4.4), recombinant EntL50A and EntL50B act synergistically, mainly at 1:1 ratio, similarly as *in vitro* synthesized EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1998a; Basanta *et al.*, 2008a).

To date, bacteriocin secretion by *Sc. cerevisiae* has only been described for the class IIa bacteriocins PedPA-1 from *P. acidilactici* PAC1.0 and Plt423 from *Lb. plantarum* 423 (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003). Contrarily to our results, recombinant strains of *Sc. cerevisiae* heterologously expressing and secreting PedPA-1 or Plt423, under control of the alcohol dehydrogenase I gene promoter (P_{ADH1}), showed antimicrobial activity on solid media. However, only low extracellular bacteriocin yields were obtained in supernatants from the recombinant yeasts, likely due to bacteriocin sticking within the cytoplasmic membrane or adsorption to the bacteriocin-producer cells, and no bacteriocin activity could be detected in supernatants without concentration (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003).

Notwithstanding the maximum amount of EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, only represented an approximately 4 and 11% of the maximum production by *E. faecium* L50 (217 and 210 ng/mgCDW, respectively) (Criado *et al.*, 2006b), the relevance of the strategy developed in this work is highlighted, among other considerations (see below), by the fact that it has permitted for the first time the independent purification of these highly-related peptides showing similar physico-chemical characteristics (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d). In the present work, recombinant EntL50A and EntL50B have been purified from culture supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, grown in the minimal medium SCGR. Previously, we described the purification of the natural bacteriocin from cultures of *E. faecium* L50 grown in the complex medium MRS broth by using a similar protocol, but lacking the gel filtration chromatography step; however, the resulting final fraction was shown to contain a mixture of both peptides EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1995, 1998a). It is known that during the purification of low molecular weight hydrophobic and/or amphiphilic bacteriocins, such as EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d), bacteriocin molecules easily aggregate with proteinaceous compounds from the medium and/or lysated cells (Cintas *et al.*, 2001). In this respect, the activity yields of the ammonium sulfate precipitation step obtained during purification of recombinant EntL50A and EntL50B were approximately 8- and 4-fold lower, respectively, than that found during purification of the natural bacteriocin (Cintas *et al.*, 1995). This effect could be due to the overall lower protein concentration in supernatants from cultures grown in SCGR broth than in MRS broth, with the concomitant reduced bacteriocin co-precipitation with proteinaceous compounds. Similarly, the requirement of a gel-filtration step for the further success in the cation-exchange chromatography of the recombinant peptides may be explained by the fact that the highly concentrated ammonium cations may compete efficiently with EntL50A and EntL50B and exclude them from the anionic ligands immobilized on the cation-exchanger matrix, especially considering that they are barely cationic low-molecular weight peptides (Cintas *et al.*, 2000d), and that a low total protein concentration is found in supernatants from cultures grown in SCGR broth. Interestingly, the antimicrobial activity of EntL50A and EntL50B was reversibly and drastically reduced (0.8 %) and stroke out, respectively, in the fractions eluted from the cation-exchanger matrix, which is likely due to the interference of the highly concentrated salts in the elution buffer (1M NaCl) with the electrostatic interaction of this peptides with the target cell surface. After the last reversed-phase FPLC purification step, recombinant EntL50A and EntL50B were each one obtained in a major absorbance peak coincident with the antimicrobial activity peak. The MALDI-TOF MS analysis of fraction containing recombinant EntL50B showed a minor peptide with exactly the same molecular mass as natural EntL50B (5,178 Da) (Cintas *et al.*, 1998a), and two major peptides with molecular masses of 5,242 and 5,226 Da. These discrepancies may be ascribed to the spontaneous modification of the two methionine residues found in the bacteriocin molecules (Met1 and Met24) (Cintas *et al.*, 1998a). In this respect, by assuming that both Met have become oxidized to methionine sulfone (MetSO₂), an addition of 64 Da to the theoretical mass leading to a molecular mass of 5,242 Da would be obtained. Likewise, the peptide with a molecular mass of 5,226 Da would be the result of

conversion of Met residues to MetSO₂ (addition of 32 Da) and methionine sulfoxide (MetSO) (addition of 16 Da). On the other hand, MALDI-TOF MS analysis of fraction containing recombinant EntL50A revealed three major peptides with a molecular mass of 6.2–6.4 kDa. At first glance, it is possible to speculate that EntL50A is not correctly processed by the Kex2 enzyme as a consequence of a reduced recognition of the cleavage site (Glu-Lys-Arg) due to a conformational interference exerted by the N-terminus of the bacteriocin molecule; however, the high similarity between EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d) allowed us to preclude this possibility. Regarding this, we favor the possibility that recombinant EntL50A is associated to an hitherto unknown compound. In this respect, it has been recently reported that heterologous production of PedPA-1 by *Pc. pastoris* resulted in secretion of recombinant bacteriocin tightly associated with some “collagen-like” material, which, contrarily to recombinant EntL50A, lacked of biological activity (Beaulieu *et al.*, 2005). Apart from this modification, and considering the high structural similarity between EntL50A and EntL50B, it is likely that one or both Met in EntL50A have also become oxidized to MetSO or MetSO₂, respectively. Regarding this, it is widely known that Met is the amino acid most sensitive to reactive oxygen, resulting in a wide range of peptide and proteins with a reduced biological activity (Brot and Weissbach, 1991; Weissbach *et al.*, 2002). Similarly, it has been very often reported that Met residues in bacteriocins become spontaneously oxidized, specially during their purification to homogeneity, leading to loss or reduction of their antimicrobial activity (Casaus *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999b; Cintas *et al.*, 2000d; Johnsen *et al.*, 2000). In this respect, it should be noted that although purified EntL50A and EntL50B exerted antimicrobial activity, it was much lower than that exerted by the peptides in culture supernatants, which could be partially due to the oxidation of the bacteriocin molecules. Thus, the amount of recombinant EntL50A and EntL50B in the fractions obtained after the purification procedure was approximately half of the value originally found in culture supernatants, while the antimicrobial activity in these fractions represented a recovery of only approximately 1–3%. In other words, the specific antimicrobial activity of recombinant EntL50A and EntL50B was drastically diminished to a 2.6 and 5.5%, respectively, during the purification process. Interestingly, it has been recently shown that replacing the single Met residue found in PedPA-1 by certain amino acids protects the peptide from oxidation, and has only minor effects on bacteriocin activity against some target cells (Johnsen *et al.*, 2000). As beer production includes a step in which the wort is thoroughly aerated to promote brewing yeast growth and thus enhance the start-up of fermentation (Vaughan *et al.*, 2005), the susceptibility of EntL50A and EntL50B to oxidative partial inactivation may hamper their application as beer biopreservatives at this stage of the brewing process. However, the possibility exists to develop engineered variants of EntL50A and EntL50B with an increased stability against oxidation by replacing one or both Met residues by other amino acids, once undoubtedly provided that this replacement is not deleterious for bacteriocin activity. In this context, replacement of Met residues at the somewhat less conserved hydrophobic and/or amphiphilic C-terminal half of bacteriocins (*e.g.*, Met24 in EntL50A and EntL50B) should be carefully addressed since, in general, this region is thought to penetrate into the hydrophobic part of the target cell membrane, thereby mediating membrane leaking and subsequent cellular death (Fimland *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Miller *et al.*, 1998;

Fimland *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2000; Fimland *et al.*, 2002; Kazazic *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005a).

EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, were further characterized by Tricine-SDS-PAGE, Western blotting and an overlay assay, which showed their strong tendency to form aggregates, likely due to hydrophobic interactions. It is worthy to note that recombinant EntL50A and EntL50B migrated with an apparent molecular mass of about 7,000 Da, while we previously found that natural EntL50 (EntL50A and EntL50B) from the wild-type strain migrated as a 3,600 Da protein (Cintas *et al.*, 1995). These differences may be explained by the following factors: (i) the bands visualized in the gels are indeed dimers of recombinant EntL50A or EntL50B, and/or (ii) these peptides migrate differently when electrophoresed independently and together, as a result of changes in the molecule conformation due to peptide-peptide interactions. Despite of that, recombinant peptides and peptide aggregates were shown to be biologically active and specifically detected using antibodies against the C-terminus of natural EntL50A and EntL50B produced by the wild-type strain *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1998a; Criado *et al.*, 2006b).

The results described hereby clearly demonstrate the suitability of the generated *MFαI_s*-containing recombinant vector pYABD01 to direct efficiently heterologous secretion of EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* through the yeast Sec system, resulting in the presence of biologically active peptides in yeast culture supernatants. Moreover, these results highlight the feasibility of the beer biopreservation strategy consisting on the use of genetically engineered bacteriocinogenic *Sc. cerevisiae* brewing yeasts as a part of a hurdle preservation technology to obtain safer and more stable beers by eliminating beer-spoilage bacteria (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2005). However, despite our promising results, further research effort is needed to achieve optimization of bacteriocin production, increased bacteriocin stability under oxidative stress and paired production of EntL50A and EntL50B by a single yeast strain (*i.e.*, by including a strong transcription terminator and a second promoter between both bacteriocin structural genes). In principle, optimization of heterologous expression and secretion of EntL50A and EntL50B may be addressed by one or more of the following strategies: (i) replacing the galactose-inducible promoter by other strong and tightly regulated promoter, such as that of the alcohol dehydrogenase I gene (Schoeman *et al.*, 1999); (ii) using a different Kozak translation initiation sequence (Kozak, 1992); (iii) taking advantages of optimal codon usage (Sreekrishna *et al.*, 1997; Tsuchiya *et al.*, 2003); (iv) using a higher copy number plasmid or multiple integrative vectors (Gorgens *et al.*, 2004); (v) incorporating a positively charged amino acid residue at the N-terminus of the signal peptide (Tsuchiya *et al.*, 2003); (vi) using protease-deficient host strains (Sreekrishna *et al.*, 1997; Trucksis *et al.*, 1997); (vii) enhancing the cellular mass by growing the producer yeasts in a fermentor (Cereghino *et al.*, 2002); and/or (viii) appropriate flask designs (Villate *et al.*, 2001).

Finally, the development of bacteriocinogenic laboratory and brewing yeast strains over-expressing these two broad spectrum antimicrobial peptides may facilitate not only future applications

of EntL50 (EntL50A and EntL50B) as biopreservative in breweries and other food industries, but also higher production of recombinant bacteriocin to conduct further studies such as those on bacteriocin structure-function relationships and molecular mode of action, which are of great applied and scientific interest and remain to be unravelled.

IV.6. REFERENCES

- Back, W.** 1994. Secondary contamination in the filling area. *Brauwelt Int.* 4: 326–328.
- Basanta, A., J. Sánchez, B. Gómez-Sala, C. Herranz, P. E. Hernández and L. M. Cintas.** 2008a. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *Int. J. Food. Microbiol.* (manuscript accepted for publication, Ref. No FOOD-D-07-00582).
- Beaulieu, L., D. Groleau, C. B. Miguez, J. F. Jetté, H. Aomari and M. Subirade.** 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *P. pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.* 43: 111–125.
- Bhunia, A. K., M. G. Johnson and B. Ray.** 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* 2: 319–322.
- Brake, A. J.** 1990. α -Factor leader-directed secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol.* 185: 408–421.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela and P. J. Barr.** 1984. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642–4646.
- Brey, S. E., S. de Costa, P. J. Rogers, J. H. Bryce, P. C. Morris, W. J. Mitchell and G. G. Stewart.** 2003. The effect of proteinase A on foam-active polypeptides during high and low gravity fermentation. *J. Inst. Brew.* 109: 194–202.
- Brot, N. and H. Weissbach.** 1991. Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biofactors* 3: 91–96.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes and P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Cebollero, E., D. González-Ramos, L. Tabera and R. González.** 2007. Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine?. *Biotechnol. Lett.* 29: 191–200.
- Cereghino, G. P. L. and J. M. Cregg.** 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 422–427.
- Cereghino, G. P. L., J. L. Cereghino, C. Ilgen and J. M. Cregg.** 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329–332.
- Cereghino, J. L. and J. M. Cregg.** 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 45–66.
- Chemler, J. A., Y. Yan and M. A. G. Koffas.** 2006. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 5: 20–28.
- Chen, Y., R. D. Ludescher and T. J. Montville.** 1997b. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4770–4777.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández and H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havårstein, P. E. Hernández and I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes and L. S. Håvarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.

- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández and P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández and I. F. Nes.** 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes and P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 281–305.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Cotter, P. D., C. Hill and R. P. Ross.** 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Criado, R.** 2006. Caracterización inmunoquímica y genética de la producción de las enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Spain.
- Criado R., D. B. Diep, Å. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández and L. M. Cintas.** 2006a. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6653–6666.
- Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P. E. Hernández and L. M. Cintas.** 2006b. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7634–7643.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill and P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans and J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193–202.
- Diep, D. B. and I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo and I. F. Nes.** 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2384–2389.
- Douglas, P., F. J. Meneses and V. Jiranek.** 2006. Filtration, haze and foam characteristics of fermented wort mediated by yeast strain. *J. Appl. Microbiol.* 100: 58–64.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen and H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Fimland, G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes and J. Nissen-Meyer.** 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3313–3318.
- Fimland, G., L. Johnsen, L. Axelsson, M. B. Brurberg, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink and J. Nissen-Meyer.** 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182: 2643–2648.
- Fimland, G., V. G. H. Eijsink and J. Nissen-Meyer.** 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* 148: 3661–3670.
- Franz, C. M. A. P., R. W. Worobo, L. E. N. Quadri, U. Schillinger, W. H. Holzapfel, J. C. Vederas and M. E. Stiles.** 1999b. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2170–2178.

- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel and A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Gajic, O., G. Buist, M. Kojic, L. Topisirovic, O. P. Kuipers and J. Kok.** 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34291–34298.
- Garneau, S., N. I. Martin and J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.
- Gibbs, G. M., B. E. Davidson and A. J. Hillier.** 2004. Novel expression system for large-scale production and purification of recombinant class IIa bacteriocins and its application to piscicolin 126. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3292–3297.
- Gorgens, J. F., J. Planas, W. H. van Zyl, J. H. Knoetze and B. Hahn-Hagerdal.** 2004. Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by *S. cerevisiae* in defined medium. *Yeast* 21: 1205–1217.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M. Cintas and P. E. Hernández.** 2004. Performance and applications of polyclonal antipeptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2247–2255.
- Gutiérrez, J., D. Bourque, R. Criado, Y. J. Choi, L. M. Cintas, P. E. Hernández and C. B. Míguez.** 2005b. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 125–131.
- Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok and P. E. Hernández.** 2006. High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 41–51.
- Hammond, J. R.** 1995. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. *Yeast* 11: 1613–1627.
- Herranz, C. and A. J. M. Driessen.** 2005. *Sec*-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1959–1963.
- Holo, H., Ø. Nilssen and I. F. Nes.** 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Ilgen, C., J. L. Cereghino and J. M. Cregg.** 2005. *Pichia pastoris*. In: “Production of recombinant proteins: novel microbial and eucaryotic expression systems”, pp. 143–162. Gellissen, G. (ed.). Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Ingham, A. B., K. W. Sproat, M. L. V. Tizard and R. J. Moore.** 2005. A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 676–683.
- Jespersen, L. and M. Jakobsen.** 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 139–155.
- Jespersen, L.** 2003. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.* 3: 191–200.
- Johnsen, L., G. Fimland, V. Eijsink and J. Nissen-Meyer.** 2000. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4798–4802.
- Johnsen, L., G. Fimland and J. Nissen-Meyer.** 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243–9250.
- Kazazic, M., J. Nissen-Meyer and G. Fimland.** 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* 148: 2019–2027.
- Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337–349.

- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–85.
- Klocke, M., K. Mundt, F. Idler, S. Jung and J. E. Backhausen.** 2005. Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 532–538.
- Kozak, M.** 1992. Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8:197–225.
- Linko, M., A. Haikara, A. Ritala and M. Penttilä.** 1998. Recent advances in the malting and brewing industry. *J. Biotechnol.* 65: 85–98.
- March, C., J. J. Manclús, A. Abad, A. Navarro and A. Montoya.** 2005. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods* 303: 92–104.
- Miller, K. W., R. Schamber, O. Osmanagaoglu and B. Ray.** 1998. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1997–2005.
- Morisset, D. and J. Frère.** 2002. Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie.* 84: 569–576.
- Nauth, K. R.** 2002. Prevention of lactic acid bacteria spoilage of beer through the use of bacteriocin-containing fermented wort. *U.S. Patent:* 0192331A1.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F., D. B. Diep and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- Ogden, K., M. J. Waites and J. R. M. Hammond.** 1988. Nisin and brewing. *J. Inst. Brew.* 94: 233–238.
- Oliveira, C. C., J. J. van den Heuvel and J. E. McCarthy.** 1993. Inhibition of translational initiation in *Saccharomyces cerevisiae* by secondary structure: the roles of the stability and position of stem-loops in the mRNA leader. *Mol. Microbiol.* 9: 521–532.
- Pretorius, I. S.** 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. *Yeast* 16: 675–729.
- Pretorius, I. S. and F. F. Bauer.** 2002. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* 20: 426–432.
- Ray, B.** 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as biopreservatives: an overview. In: “*Food biopreservatives of microbial origin*”, pp. 177–205. Ray, B. and M. A. Daeschel (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, EE.UU.
- Richard, C., D. Drider, K. Elmorjani, D. Marion and H. Prévost.** 2004b. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 4276–4284.
- Ringø, E., U. Schillinger and W. Holzapfel.** 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: “*Microbial Ecology of the Growing Animal, 2*”, pp. 408–443. Holzapfel, W. and P. Naughton (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, United Kingdom.
- Ross, R. P., S. Morgan and C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Russo, S., R. Berkovitz Siman-Tov and G. Poli.** 1995. Yeasts: from genetics to biotechnology. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 14: 133–157.
- Sakamoto, K. and W. N. Konings.** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 105–124.

- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia and M. Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1633–1641.
- Schägger, H. and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368–379.
- Schiffer, M., C. -H. Chang and F. J. Stevens.** 1992. The function of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng.* 5: 213–214.
- Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks and I. S. Petrorius.** 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647–656.
- Schuller, D. and M. Casal.** 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 292–304.
- Schuster, M., A. Einhauer, E. Wasserbauer, F. Süßenbacher, C. Ortner, M. Paumann, G. Werner and A. Jungbauer.** 2000. Protein expression in yeast; comparison of two expression strategies regarding protein maturation. *J. Biotechnol.* 84: 237–248.
- Skaugen, M., L. M. Cintas and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “Genetics of lactic acid bacteria”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, EE.UU.
- Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam and L. A. Birkenberger.** 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55–62.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Trucksis, M., T. L. Conn, A. Fasano and J. B. Kaper.** 1997. Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*. *Infect. Immun.* 65: 4984–4988.
- Tsuchiya, Y., K. Morioka, J. Shirai, Y. Yokomizo and K. Yoshida.** 2003. Gene design of signal sequence for effective secretion of protein. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 3: 261–262.
- Van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl and L. M. T. Dicks.** 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 29–40.
- Vaughan, A., T. O’Sullivan and D. van Sinderen.** 2005. Enhancing the microbiological stability of malt and beer – a review. *J. Inst. Brew.* 111: 355–371.
- Vega-Laso, M. R., D. Zhu, F. Sagliocco, A. J. Brown, M. F. Tuite and J. E. McCarthy.** 1993. Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J. Biol. Chem.* 268: 6453–6462.
- Villate, F., A. S. Hussein, T. T. Bachmann and R. D. Schmid.** 2001. Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 463–465.
- Von Mollendorff, J. W., S. D. Todorov and L. M. T. Dicks.** 2007. Factors affecting the adsorption of bacteriocins to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142: 209–220.
- Weissbach, H., F. Etienne, T. Hoshi, S. H. Heinemann, W. T. Lowther, B. Matthews, G. St John, C. Nathan and N. Brot.** 2002. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 172–178.
- Yang, R., M. C. Johnson and B. Ray.** 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355–3359.

Zhang, H., S. Yoshida, T. Aizawa, R. Murakami, M. Suzuki, N. Koganezawa, A. Matsuura, M. Miyazawa, K. Kawano, K. Nitta and Y. Kato. 2000. In vitro antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2701–2705.

CAPÍTULO V / CHAPTER V

**Expresión y secreción heteróloga de la enterocina L50
(L50A y L50B) biológicamente activa por la levadura
metilotrófica *Pichia pastoris***

***Heterologous Expression and Secretion of Biologically Active
Enterocin L50 (L50A and L50B) by the Methylophilic Yeast
Pichia pastoris***

V.1. ABSTRACT

The broad antimicrobial spectrum of the multiple bacteriocin producer strain *Enterococcus faecium* L50 against spoilage and food-borne pathogenic bacteria, and human and animal clinical pathogens is mainly due to the production of enterocin L50 (EntL50), a bacteriocin consisting of two leader-less antimicrobial peptides, enterocin L50A (EntL50A) and enterocin L50B (EntL50B). In this work, we report the successful expression and secretion of biologically active EntL50A and EntL50B, separately and together, by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The structural genes of EntL50A (*entL50A*) and EntL50B (*entL50B*), fused to the yeast gene region encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal (*MF α 1_s*), were cloned, separately and together (*entL50AB*), into the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ α A, under control of the methanol-inducible alcohol oxidase promoter (P_{AOX1}), generating the plasmids pBAS01 (*entL50A*), pBAS02 (*entL50B*), and pBAS03 (*entL50AB*). The recombinant plasmids were further integrated into the genome of *Pc. pastoris* X-33 resulting in the strains *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03). EntL50A and/or EntL50B production by recombinant yeasts, grown both in buffered methanol-complex and minimal media (BMMY and BMM, respectively), was evaluated and quantified by using microbiological methods and specific anti-LR1-KLH (for EntL50A), and anti-LR2-KLH (for EntL50B) antibodies in a noncompetitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (NCI-ELISA). The recombinant yeasts displayed antimicrobial activity both in solid and liquid media, and the maximum antimicrobial activity was found in culture supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (310 BU/mg cell dry weight [CDW]) grown in BMM, followed by *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (95 BU/mgCDW) grown in BMMY, and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (65 BU/mgCDW) grown in BMM. Likewise, biologically active recombinant EntL50A and/or EntL50B were efficiently secreted both in media being the maximum production achieved by cultures of *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (1,240 ng of EntL50B/mgCDW) grown in BMMY, followed by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (228.5 ng of EntL50A/mgCDW) grown in BMM, and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (39.3 ng of EntL50B/mgCDW and 32.8 ng of EntL50A/mgCDW) grown in BMM. Both recombinant EntL50A and EntL50B were purified from supernatants of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively, grown in BMMY, and their mass spectrometry analyses demonstrated that both peptides are correctly processed by the Kex2 enzyme, and that EntL50A is probably associated to an hitherto unknown yeast compound. Tricine SDS-PAGE and Western blotting analyses of recombinant EntL50A and EntL50B revealed one major band with the expected size and their tendency to aggregate, and an overlay assay demonstrated the biological activity of both bacteriocin peptides processed and secreted by *Pc. pastoris* directed by MF α 1_s through the yeast Sec system.

V.2. INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in food and beverage fermentations, either as natural microflora or starter culture added under controlled conditions to ensure and enhance the development of the desired changes in texture, flavour, colour, digestibility and nutritional qualities of the fermented products (Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 1998b; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Deegan *et al.*, 2006). Moreover, during the last years insight has been gained into the potential use of certain LAB to extend the shelf life and warrant the safety of foods and beverages in combination with other antimicrobial barriers (Stiles, 1996; Ross *et al.*, 2002; Ringø *et al.*, 2005; Vaughan *et al.*, 2005; Deegan *et al.*, 2006). This so-called biopreservative effect is mainly due to the ability of LAB to inhibit the growth of spoilage and food-borne pathogenic bacteria, especially by the production of fermentation end products (*e.g.*, lactic acid) and the secretion of ribosomally-synthesized antimicrobial peptides referred to as bacteriocins (Cintas *et al.*, 2001; Cleveland *et al.*, 2001; Diep and Nes, 2002; Deegan *et al.*, 2006).

Bacteriocins are a heterogeneous group of ribosomally synthesized antimicrobial peptides produced by both Gram-negative and Gram-positive bacteria (Jack *et al.*, 1995; Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). LAB bacteriocins may be classified into three main classes: (I) the lantibiotics, or post-translationally modified peptides; (II) the non-modified, small, heat-stable peptides; and (III) the large, heat-labile protein bacteriocins. Class II bacteriocins are non-modified small heat-stable peptides (Nes *et al.*, 1996; Nes and Holo, 2000; Eijsink *et al.*, 2002), that are grouped into five subclasses: (i) the subclass IIa comprises of pediocin-like bacteriocins with a conserved N-terminal motif (YGNGVxC); (ii) the subclass IIb is made up of bacteriocins whose full activity is dependent on the presence of two different peptides; (iii) the subclass IIc is made up of leaderless bacteriocins; (iv) the subclass IId includes the circular bacteriocins; and (v) the subclass IIE includes other peptide-bacteriocins (Garneau *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007).

Production of most class II bacteriocins relies on a well-conserved genetic organization including at least four genes which may, or may not, be located on the same transcription unit, but are usually organized in one or two operon-like structures in gene clusters: (i) the structural gene encoding the prebacteriocin; (ii) the gene encoding the dedicated immunity protein, which confers producer self-protection against the toxicity of the bacteriocin; (iii) a gene encoding a dedicated ATP-binding cassette (ABC) transporter required for processing and transport of the bacteriocin; and (iv) a gene encoding an accessory protein required for proper bacteriocin externalization (Nes *et al.*, 1996; Skaugen *et al.*, 2003). In those cases of bacteriocins whose production is transcriptionally regulated by a three-component signal-transduction system, three additional genes encoding a dedicated pheromone peptide (the induction factor), a histidin protein kinase (the sensor protein), and a response regulator (the effector protein) are also found (Nes *et al.*, 1996; Nes and Eijsink, 1999; Ennahar *et al.*, 2000; Skaugen *et al.*, 2003). All lantibiotics and most class II bacteriocins are synthesized as biologically inactive precursors containing an N-terminal extension (the so-called double-glycine-type leader

sequence or the Sec-dependent signal peptide), which is cleaved off concomitantly with secretion of the active bacteriocin (Nes *et al.*, 1996; Cintas *et al.*, 2001; Skaugen *et al.*, 2003; Drider *et al.*, 2006). Interestingly, a few LAB bacteriocins (subclass IIc) described to date are synthesized without an N-terminal extension, including EntL50 (EntL50A and EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a), enterocin Q (EntQ) (Cintas *et al.*, 2000d), enterocin EJ97 (Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003), and the bacteriocin LsbB (Gajic *et al.*, 2003). For some of these leaderless bacteriocins it has been shown that secretion is mediated by ABC transporters or, even, ABC-type multidrug resistance (MDR) transporters (Gajic *et al.*, 2003; Sánchez-Hidalgo *et al.*, 2003; Criado *et al.*, 2006a).

Notwithstanding bacteriocins may exert their antimicrobial effect by different mechanism, the majority of these compounds share a common mode of action depending on the pore formation in the cell envelope of sensitive microorganisms (Moll *et al.*, 1999b; Nes and Holo, 2000; Deegan *et al.*, 2006). Nisin A (NisA) and other class I lantibiotic bacteriocins form pores that disrupt the proton motive force and the pH equilibrium causing leakage of ions and hydrolysis of ATP resulting in cell death (Benz *et al.*, 1991; Deegan *et al.*, 2006). Moreover, it has been shown that NisA also interferes with cell wall biosynthesis by binding to the peptidoglycan precursor lipid II (Breukink *et al.*, 1999; Diep and Nes, 2002; Deegan *et al.*, 2006). Most class II bacteriocins form pores that cause disruption of the cell membrane, depletion of intracellular ATP and leakage of amino acids and ions, and subsequent cellular death (Diep and Nes, 2002; Deegan *et al.*, 2006; Drider *et al.*, 2006; Diep *et al.*, 2007). The hydrophilic, cationic and highly conserved N-terminal region of class IIa bacteriocins seems to mediate bacteriocin binding to the target cell surface through electrostatic interactions, while the somewhat less conserved and more hydrophobic and/or amphiphilic C-terminal region is thought to determine their antimicrobial spectrum and to penetrate into the hydrophobic part of the target cell membrane, thereby mediating membrane leaking (Fimland *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Miller *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2000; Fimland *et al.*, 2002; Kazazic *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005a). Although not fully elucidated, the role of the mannose permease EII_t^{man} of the phosphotransferase system, a sugar uptake/phosphorylation system, as a putative receptor for class IIa bacteriocins interacting with the membrane-permeabilizing C-terminal hairpin domain and thus being involved in bacteriocin target cell specificity has been suggested (Ramnath *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005a; Deegan *et al.*, 2006; Drider *et al.*, 2006; Diep *et al.*, 2007).

The increasing preferences of actual consumers for safe and minimally processed products with no chemical preservatives, but possessing an adequate and extended shelf-life, has spurred a world-wide scrutiny over the past few years for the identification and characterization of bacteriocins suitable for application as food biopreservatives (Cleveland *et al.*, 2001; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006). However, despite of the large and evergrowing number of LAB bacteriocins identified and, in some cases, characterized so far, NisA is the only bacteriocin legally accepted for use as food additive in some foods and beverages. In this respect, this bacteriocin is internationally approved in over 50 countries, including Europe (since 1983) and the United States (since 1988), as food additive in certain types of cheeses (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Cleveland *et al.*, 2001; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Cotter *et al.*, 2005b). Likewise, NisA has been aproved as beer additive in Australia and New Zealand

at levels compliant with good manufacturing practice (Delves-Broughton *et al.*, 1996). The difficulties encountered for legal approval of new bacteriocins as food additives, as well as other factors including the low bacteriocin production from the bacteriocinogenic cultures, which hinder biochemical characterization of bacteriocins and evaluation of their *in situ* effectiveness in food systems and safety and toxicological evaluation, have spurred the development and evaluation of two alternative bacteriocin-based food biopreservation strategies consisting on (i) the use of a substrate previously fermented by a bacteriocinogenic strain as a food ingredient, or (ii) the inoculation of a culture to produce the bacteriocin *in situ* in fermented foods (Stiles, 1996; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006). However, the practical application of these strategies may be hindered by one or more of the following factors: (i) the unsuitability of the food substrate composition and/or the conditions prevailing during the food fermentation processes for bacterial growth and/or bacteriocin production; (ii) the spontaneous loss of bacteriocin-production ability; (iii) the low bacteriocin production and the difficulties encountered for scaling up; (iv) the potential negative effects of the bacteriocinogenic microorganism metabolic activities on the organoleptic characteristics of the fermented product; and, for some bacteriocinogenic LAB species (*e.g.*, the enterococci, see below) (v) the questionability of their safety for human and animal consumption (*i.e.*, Generally Recognized As Safe *status*, GRAS or its European synonymus concept of Qualified Presumption of Safety, QPS) (Daeschel, 1993; Holzapfel *et al.*, 1995; Leroy *et al.*, 2002; Leroy and de Vuyst, 2005; de Vuyst and Leroy, 2007; Hummel *et al.*, 2007b; Gálvez *et al.*, 2007). To cope with the aforementioned challenges, a great interest in the production of the most active bacteriocins in heterologous hosts has raised during the last years, which may lead to the: (i) availability of selected hosts recognized as GRAS or QPS, adapted to particular food environments (*e.g.*, starter or adjunct cultures) with the ability to produce bacteriocins *in situ*; (ii) generation of food ingredients with adequate bacteriocin yields; (iii) strict control of bacteriocin gene expression at the transcriptional and/or translational levels; (iv) optimization of bacteriocin production and purification; and (v) construction of multibacteriocinogenic strains with a wider antagonistic spectrum and more effective to avoid the emergence of bacteriocin-resistant bacterial populations, all of them contributing to a more effective and versatile applicability of bacteriocins and bacteriocinogenic strains as food biopreservatives and starter/protective cultures, respectively (Makrides, 1996; Gutiérrez *et al.*, 2005c; Gutierrez *et al.*, 2006).

The enterococci are widely known for their important role in the fermentation and ripening of cheeses, as well as for their presence in other fermented products, such as sausages, vegetables and olives (Franz *et al.*, 1999a, 2003; Giraffa, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Furthermore, given their commensal *status*, enterococci are widely used as probiotics for humans and farm animals (Tannock and Cook, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier and Serror, 2008). On the other hand, enterococci are unique in their great potential to produce a great variety of bacteriocins (referred to as enterocins), all belonging to class II except the two-peptide lantibiotic cytolysin (Gilmore *et al.*, 1994), the lytic protein enterolysin A (Nilsen *et al.*, 2003) and the lantibiotic columbicin A (Martín, 2006), which are good candidates for food biopreservation due to their technological properties and broad antimicrobial spectrum against spoilage and food-borne pathogenic bacteria, including *Listeria*

monocytogenes (Giraffa, 1995; Cintas *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2007; Nes *et al.*, 2007). However, the use of enterococci as food-grade starter and/or protective cultures is highly controversial and should be approached with caution, since many isolates within this genus, mainly within the species *Enterococcus faecalis*, have emerged as human opportunistic pathogens encoding potential virulence factors and carrying antibiotic resistance genes (Franz *et al.*, 1999a; Eaton and Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007a; Ogier and Serror, 2008). In this respect, it should be noted that, in general, enterococci of food origin do not show resistance to clinically relevant antibiotics, such as ampicillin, penicillin, vancomycin and gentamicin (Eaton and Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007b; Ogier and Serror, 2008). Despite of this, and to preclude concerns about the safety of enterococci, the possibility exists to heterologously express enterocin genes in alternative and safer backgrounds, including industrially interesting food-grade LAB strains. However, studies reported to date are very scarce and limited to those performed with the pediocin-like (subclass IIa) enterocin A (EntA) and enterocin P (EntP), firstly identified in *E. faecium* CECT492 (Aymerich *et al.*, 1996) and *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997), respectively, and the circular (subclass IId) enterocin AS-48 (EntAS-48) from *E. faecalis* S-48 (Gálvez *et al.*, 1989). In this respect, EntA was heterogously produced in *Lactococcus lactis* but low production levels were achieved (O’Keeffe *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000b). On the other hand, heterologous production of EntAS-48 by non-enterococcal host could not be achieved in a recent reported (Fernández *et al.*, 2007). Contrarily to these results, EntP from *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997) has been produced by heterologous hosts including *Lc. lactis* (Herranz and Driessen, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2006), *Escherichia coli* (Gutiérrez *et al.*, 2005c), *Methylobacterium extorquens* (Gutiérrez *et al.*, 2005b), and *Pc. pastoris* (Gutiérrez *et al.*, 2005a).

Yeast, mainly *Saccharomyces cerevisiae* and *Pc. pastoris*, have been frequently used for the large-scale heterologous production of a variety of functional proteins (Cereghino and Cregg, 1999; Schoeman *et al.*, 1999; Cereghino and Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2005). Moreover, the methylotrophic yeast *Pc. pastoris* has been successfully used for the heterologous expression of hundreds of proteins (Cereghino and Cregg, 2000; Cereghino *et al.*, 2002; Ilgen *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Sebban-Kreuzer *et al.*, 2006). The increasing popularity of this expression system can be attributed to several factors, most importantly: (i) the simplicity of techniques needed for the genetic manipulation of *Pc. pastoris*, and their similarity to those of *Sc. cerevisiae*, one of the most well-characterized experimental systems in modern biology; (ii) the availability of expression systems as commercially kits containing efficient vectors with strong promoters permitting the integration of expression plasmids at specific sites in the *Pc. pastoris* genome, in either in single or multiple copies, and driving high-level expression of foreign genes; (iii) the existence of well-established fermentation methods that allow the growth of *Pc. pastoris* at high cell densities, and thus the production of foreign proteins at high levels (10 to 100-fold higher than in *Sc. cerevisiae*); and (iv) the ability of *Pc. pastoris* to perform many protein modifications, such as glycosilation, disulfide-bond formation, and proteolytic processing (Cereghino and Cregg, 1999, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Sebban-Kreuzer *et al.*, 2006). In spite of the high versatility of this yeast expression system,

heterologous production of bacteriocins by *Pc. pastoris* has been barely addressed. In this respect, pediocin PA-1 (PedPA-1) from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 was expressed and secreted by *Pc. pastoris* but the bacteriocin was rendered biologically inactive (Beaulieu *et al.*, 2005). On the contrary, the heterologous production of biologically active EntP from *E. faecium* P13 by *Pc. pastoris* demonstrated the possibility of developing bacteriocin-producing *Pc. pastoris* strains (Gutiérrez *et al.*, 2005a).

E. faecium L50, a strain isolated from a Spanish dry-fermented sausage (Cintas *et al.*, 1995), produces three bacteriocins (four peptides): (i) EntP is a pediocin-like bacteriocin (subclass IIa) synthesized with a Sec-dependent N-terminal extension (signal peptide); (ii) EntL50 is a two-leader-less peptide bacteriocin; and (iii) EntQ is a subclass IIc leader-less bacteriocin (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d; Criado *et al.*, 2006b). Moreover, multiple bacteriocin production by *E. faecium* L50 is a temperature-regulated process: EntL50 is produced at 16–42°C but production is negligible when the growth temperature is above 37°C, whereas EntP and EntQ are synthesized at temperatures ranging from 16 to 47°C (Cintas *et al.*, 2000d; Criado *et al.*, 2006b). Recently, Criado *et al.* (2006a) have demonstrated that the genetic determinants of *E. faecium* L50 required for the production of, and immunity against, EntL50, EntQ and EntP are located on the 50-kb-plasmid pCIZ1, the 7.4-kb-plasmid pCIZ2, and the pCIZ1 and chromosome from *E. faecium* L50, respectively. EntL50 is composed of two highly-related leader-less antimicrobial peptides termed EntL50A and EntL50B, consisting of 44 and 43 amino acids, respectively, and sharing 72% sequence identity, most pronounced at the N-terminus of the molecules (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d), and thus may be categorized in either subclass IIb and IIc. The structural genes *entL50A* and *entL50B* are colinearly arranged and followed by a *rho*-independent transcriptional terminator, and Northern analyses revealed that both genes are cotranscribed in a single small bicistronic mRNA (*ca.*, 0.4 kb) (Cintas *et al.*, unpublished results; Criado, 2006). Expression *in vivo* in *E. coli* and *in vitro* coupled transcription/translation experiments revealed that *entL50A* and *entL50B* are the only genes required to obtain EntL50 activity, strongly indicating that these bacteriocins are not post-translationally modified (Cintas *et al.*, 1998a). Besides, *in vitro* synthesis analyses also demonstrated that EntL50A and EntL50B possess antimicrobial activity on their own, being EntL50A the most active peptide, but when the two peptides were combined a synergistic effect was observed (Cintas *et al.*, 1998a; Basanta *et al.*, 2008a). Recently, it has been demonstrated that EntP and EntQ are secreted by the Sec translocase (Herranz and Driessen, 2005) and a dedicated ABC-type MDR transporter (Criado *et al.*, 2006a), respectively. However, the mechanism involved in secretion of EntL50 (EntL50A and EntL50B) still remains unknown, although the involvement of a multicomponent ABC transporter in bacteriocin externalization has been recently suggested (Criado, 2006). *E. faecium* L50 possesses a broad antimicrobial spectrum, mainly exerted by EntL50 (EntL50A and EntL50B), including: (i) food-borne pathogenic bacteria, such as *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* and *L. monocytogenes*; (ii) food-spoilage LAB, such as *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp., etc.; and (iii) human and animal clinical pathogens, such as *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus parasanguis* and *Streptococcus pneumoniae* (Cintas *et al.*, 1998b, 2000d; Basanta *et al.*,

2008a). In recent previous works, we reported the interesting characteristics and technological properties of EntL50 as beer biopreservative (Basanta *et al.*, 2008a), and constructed the expression and secretion vector pYABD01 for *Sc. cerevisiae*, intended for the development of bacteriocinogenic yeast strains heterologously producing EntL50 (EntL50A and EntL50B) (Basanta *et al.*, 2008b). For this purpose, *entL50A* and *entL50B* were cloned, separately and together, in pYABD01 under control of the galactose-inducible promoter (P_{GAL1}), and the respective proteins, fused to MF $\alpha 1_s$, further expressed in *Sc. cerevisiae*. Although, recombinant EntL50A and EntL50B were secreted as biologically active peptides by *Sc. cerevisiae*, directed by MF $\alpha 1_s$ through the yeast Sec system, it was not possible to achieve their simultaneous production by a single yeast strain, and the bacteriocin yields were lower than expected.

To cope with these inconveniences, we evaluate in the present work the use and functionality of *Pc. pastoris* as heterologous host for the expression and secretion of EntL50 (EntL50A and EntL50B). For this purpose, *entL50A* and *entL50B*, fused to MF $\alpha 1_s$, were cloned, separately and together, into the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ αA , under control of P_{AOX1} . By using this approach, bacteriocinogenic strains of *Pc. pastoris* heterologously producing one or both biologically active leader-less peptides of EntL50 (EntL50A and/or EntL50B) were generated.

V.3. MATERIALS AND METHODS

V.3.1. Microorganisms, plasmids, media, and culture conditions

The sources and relevant genotypes of microorganisms and plasmids used in this work are listed in Table V.1. EntL50 (EntL50A and EntL50B)-producing strain *E. faecium* L50 and the indicator strain *Pediococcus damnosus* CECT4797 (EntL50 sensitive; EntL50^s) (Table III.2) (Basanta *et al.*, 2008a) were grown aerobically in MRS broth (pH 6.2; Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom) at 30°C. *E. coli* High Efficiency JM109 (Promega Corporation, Madison, Wis.), and *E. coli* MAX Efficiency DH5 α (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif.) competent cells were propagated in Luria Bertani (LB) broth (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Mo.) at 37°C with shaking (200–250 rpm). Kanamycin (Kan, 50 μ g/ml), and zeocin (Zeo, 25 μ g/ml) from Sigma-Aldrich and Invitrogen, respectively, were added to LB medium as selective agents for selection of *E. coli* transformants. *Pc. pastoris* X-33 (Invitrogen) strains were cultured in YPD broth (10 g/l yeast extract, Oxoid; 20 g/l peptone, Oxoid; 20 g/l glucose, Panreac Química S. A., Barcelona, Spain) (Beaulieu *et al.*, 2005) at 30°C with shaking (200–250 rpm). Yeast transformants were selected in YPD plates supplemented with Zeo (100 μ g/ml), and sorbitol (1 M, Sigma-Aldrich) at 30°C for 96 h. In order to determine bacteriocin production kinetics, yeast transformants were precultured in buffered glycerol complex medium BMGY (10 g/l yeast extract; 20 g/l peptone; 100 mM potassium phosphate [pH 6], Merck Farma y Química S. A., Barcelona, Spain; 1.34% yeast nitrogen base without aminoacids, Invitrogen; $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, Sigma-Aldrich; 1% glycerol, Sigma-Aldrich) (Gutiérrez *et al.*, 2005a) until the cultures

Table V.1. Microorganisms and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Source or reference ^b
Bacterial strains		
<i>Enterococcus faecium</i> L50	EntL50 (EntL50A and EntL50B), EntP, and EntQ producer	DNBTA
<i>Pediococcus damnosus</i> 4797	Indicador microorganism, EntL50 ^s -EntP ^s -EntQ ^r	CECT
<i>Escherichia coli</i> High Efficiency JM109	Host strain, F: <i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>) <i>relA1 supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>). F': <i>traD36 proAB lacI^qZAM15</i>	Promega
<i>E. coli</i> MAX Efficiency DH5 α	Host strain, <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZAM15</i>) <i>hsdR17 recA1 gyrA96 thi -1 relA1</i>	Invitrogen
Yeast strains		
<i>Pichia pastoris</i> X-33	Host strain, wild-type strain for selection on Zeo, Mut ⁺	Invitrogen
<i>Pc. pastoris</i> X-33A	<i>Pc. pastoris</i> X-33 derivative carrying pBAS01, EntL50A producer, Zeo ^r	This work
<i>Pc. pastoris</i> X-33B	<i>Pc. pastoris</i> X-33 derivative carrying pBAS02, EntL50B producer, Zeo ^r	This work
<i>Pc. pastoris</i> X-33AB	<i>Pc. pastoris</i> X-33 derivative carrying pBAS03, EntL50A and EntL50B producer, Zeo ^r	This work
<i>Pc. pastoris</i> X-33C	<i>Pc. pastoris</i> X-33 derivative carrying pPICZ α A, Zeo ^r	This work
Plasmids		
pPICZ α A	<i>Pc. pastoris</i> 3.6-kb expression and secretion vector carrying methanol-inducible promoter (<i>P_{AOX1}</i>), 5' <i>AOX1</i> region, <i>MFαI_s</i> , Zeo ^r	Invitrogen
pTBS02	PCR2.1-TOPO derivative carrying <i>entL50A</i>	Basanta <i>et al.</i> , 2008b
pTBS03	PCR2.1-TOPO derivative carrying <i>entL50B</i>	Basanta <i>et al.</i> , 2008b
pBAS01	pPICZ α A derivative carrying <i>entL50A</i>	This work
pBAS02	pPICZ α A derivative carrying <i>entL50B</i>	This work
pBAS03	pBAS01 derivative carrying <i>MFαI_s</i> fused in frame to <i>entL50B</i>	This work

^a*MF α I_s*, yeast gene region encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal.

^bAbbreviations: CECT, Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain); DNBTA, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain).

reached an optical density between 2–6 measured at 600 nm (OD₆₀₀). Subsequently, the cells were harvested by centrifugation, washed with BMGY (without glycerol), and resuspended, to an OD₆₀₀ of 1, in buffered methanol-complex medium BMMY (10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 100 mM potassium phosphate [pH 6]; 1.34% yeast nitrogen base without aminoacids; 4×10^{-5} % biotin; 0.5% methanol, Merck), and in buffered methanol-minimal medium BMM (100 mM potassium phosphate [pH 6], 1.34% yeast nitrogen base without aminoacids, 4×10^{-5} % biotin, 0.5% methanol) (Gutiérrez *et al.*, 2005a). Agar plates were made by adding 1.5 or 2% (wt/vol) agar (Oxoid) to the broth media for LAB and *E. coli*, and *Pc. pastoris*, respectively. MRS soft agar used in the spot-on-agar test (SPAT), described bellow, contained 0.8% (wt/vol) agar.

V.3.2. Basic genetic techniques and enzymes

Small and large scale plasmid DNA isolation from *E. coli* recombinants was carried out using the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Diagnostics S. L., Madrid, Spain) and the QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), respectively. Total genomic DNA from recombinant yeasts was isolated using the Wizard[®] DNA Purification Kit as suggested by the manufacturer (Promega). Oligonucleotide primers (Table V.2) were obtained from Sigma-Genosys Ltd. (Cambridge, United Kingdom). PCR amplifications were performed in 50 μ l reaction mixtures containing 1 μ l of purified DNA, 70 pmol of each primer, and 1 U of Platinum *Taq*[®] DNA polymerase (Invitrogen).

Samples were subjected to an initial cycle of denaturation (97°C for 2 min), followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 s), annealing (59 to 62.5°C for 30 s), and elongation (72°C for 30 to 75 s), ending with a final extension step at 72°C for 7 min in a Techgene DNA thermal cycler (Techne, Cambridge, United Kingdom). The PCR-generated fragments were extracted from agarose gels using the Real Clean Matrix kit (Durviz S. L. U., Madrid, Spain), and purified by the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). PCR fragments and plasmids were analyzed by electrophoresis on 2 and 0.8% (wt/vol) agarose (Pronadisa, Madrid, Spain) gels, respectively, at 90 V for 1 h, using the 100-bp DNA and Supercoiled DNA ladders (Invitrogen) as molecular weight markers, respectively, with the Gel Doc 1000 documentation system (Bio-Rad Laboratories S. A., Madrid, Spain) used for image acquisition and computer analysis. Nucleotide sequencing of both strands of purified PCR products was done using an ABI Prism BigDye cycle sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq DNA polymerase and dye-labeled terminators and an ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, Calif.) at the DNA Sequencing Service of Sistemas Genómicos (Valencia, Spain). Platinum Taq[®] DNA polymerase (Invitrogen), DNA restriction enzymes (New England Biolabs Inc., Beverly, Mass.), and T4 DNA ligase (Promega) were used according to the supplier's instructions. *E. coli* High Efficiency JM109 competent cells were chemically transformed as suggested by the manufacturer (Promega). *Pc. pastoris* X-33 competent cells were obtained and transformed using the EasySelect[™] *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). The electrotransformation of *Pc. pastoris* X-33 competent cells was performed using a Gene Pulser (Bio-Rad) with the following parameters: 2.5 kV, 400 Ω , 25 μ F and 6–8 s.

V.3.3. Construction of the recombinant plasmids pBAS01, pBAS02 and pBAS03, and transformation in *Pichia pastoris* strains

The specific primers used for construction and sequence confirmation of recombinant plasmids are listed in Table V.2. The TOPO derivative recombinant plasmids pTBS02 and pTBS03 carrying *entL50A* and *entL50B* structural genes, respectively, previously constructed by Basanta *et al.*, 2008b were isolated from *E. coli* MAX Efficiency DH5 α recombinant strains as described above, and digested with *Xho*I and *Xba*I. The 164-bp (fragment L50A) and 148-bp (fragment L50B) fragments were purified from agarose gels as described above. These fragments contained the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site (AAAAGA) of MF α _{1s}, required for protein processing during secretion, fused in frame to *entL50A* and *entL50B*. The purified fragments were ligated with T4 DNA ligase into the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ α A, previously digested with *Xho*I and *Xba*I, yielding the plasmids pBAS01 and pBAS02, respectively. In these plasmids, *entL50A* and *entL50B* expression is under control of the methanol-inducible alcohol oxidase promoter (P_{AOX1}) and thus induced by methanol and repressed by glycerol. Fig. 5.1 summarizes the genetic constructions and the strategy employed for cloning of *entL50A* and *entL50B* in pPICZ α A. *E. coli* High Efficiency JM109 competent cells were chemically transformed with these recombinant plasmids, and the resulting transformants confirmed by: (i) plasmid isolation and digestion with *Xho*I and *Xba*I; (ii) PCR

Table V.2. Primers and PCR products used in this study

Primer or PCR product	Nucleotide sequence ^a (5'-3') and description ^b	Fragment(s) amplified
Primers		
5AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	α -L50A- α -L50B
3AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC	α -L50A- α -L50B
Alfa5- <i>Xba</i> I	AATTATATCTAGA ATTTCGAAACGATGAGATTTCCTTCAATTTT ACTG	α -L50B
L50B9- <i>Sal</i> I	ATAAGTTGTCGACA ACATTAATGTCTTTTATAGCCATTTTCAAT TTGATC	α -L50B
AlfaF	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	FA and FB
L50A3	ATGGGAGCAATCGCAAAATTAGTAGCAAAG	<i>entL50A</i>
L50A4	ATTTTAAATATGTTTTTAATCCACTCAATG	FA and <i>entL50A</i>
L50B3	ATGGGAGCAATCGCAAACTAGTGAC	<i>entL50B</i>
L50B4	AACATTAATGTCTTTTATAGCCATTTTCAATTTG	FB and <i>entL50B</i>
PCR products		
Fragment <i>entL50A</i>	138-bp fragment containing structural gene of EntL50A (<i>entL50A</i>)	
Fragment <i>entL50B</i>	136-bp fragment containing structural gene of EntL50B (<i>entL50B</i>)	
Fragment FA	190-bp fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50A</i>	
Fragment FB	188-bp fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50B</i>	
Fragment α -L50B	427-bp fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50B</i>	
Fragment α -L50A- α -L50B	1,030-bp fragment containing <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50A</i> and <i>MFα1_s</i> fused to <i>entL50B</i>	

^aCleavage sites for restriction enzymes are underlined in the primers; Boldface type indicates nucleotide tails added to the specific sequences to ensure proper functioning of the restriction enzymes.

^b*MF α 1_s*, yeast gene encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal including the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site.

amplification of 190-bp (fragment FA), and 188-bp (fragment FB) fragments using the primer pairs AlfaF-L50A4, and AlfaF-L50B4, respectively; and (iii) PCR amplification of 138-bp (fragment *entL50A*), and 136-bp (fragment *entL50B*) fragments using the *entL50A* and *entL50B* specific primer pairs L50A3-L50A4, and L50B3-L50B4, respectively. *E. coli* single colonies were used as DNA templates for PCR amplifications. Confirmation of the correct nucleotide sequence of pBAS01 and pBAS02 was done, as described above, using the pPICZ α A specific primer pairs AlfaF and 3AOX1. The plasmid pPICZ α A, lacking the bacteriocin structural genes, was also chemically transformed into *Pc. pastoris* X-33, and the resulting *Pc. pastoris* X-33C strain was used as a control.

5–10 μ g of pBAS01 and pBAS02 vectors isolated as described above were linearized with *Sac*I. The linearized vectors were electroporated into *Pc. pastoris* X-33 competent cells, and transformants (*Pc. pastoris* X-33A and *Pc. pastoris* X-33B, respectively) were selected on YPD plates supplemented with Zeo (100 μ g/ml), and sorbitol (1 M) as described above. In order to express and secrete simultaneously EntL50A and EntL50B, a new recombinant plasmid pBAS03 was constructed, essentially as described above for pBAS01 and pBAS02 (Fig. 5.1). Briefly, pBAS02 was used as template for PCR amplification of a 427-bp *Xba*I-*Sal*I (fragment α -L50B), containing *MF α 1_s* fused in frame to *entL50B*, and using Alfa5-*Xba*I and L50B9-*Sal*I as specific PCR primers (Table V.2). The forward primer, Alfa5-*Xba*I, contained a *Xba*I cleavage site, while the reverse primer, L50B9-*Sal*I, included a *Sal*I cleavage site. The purified fragment α -L50B was cloned downstream of fragment L50A into pBAS01, previously digested with *Xba*I and *Sal*I, to yield the recombinant plasmid pBAS03 containing the fragment α -L50A- α -L50B. This recombinant plasmid was chemically transformed into

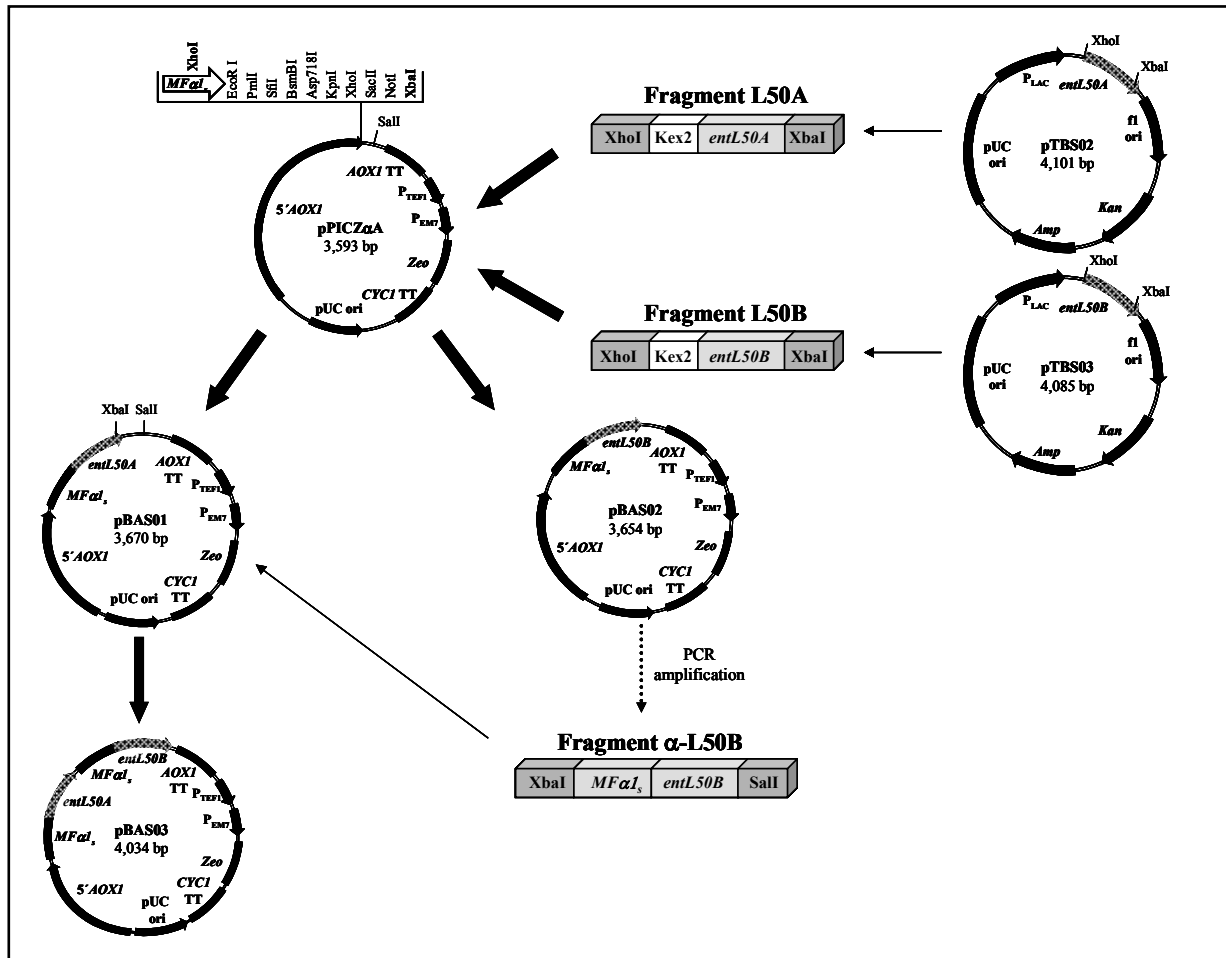


Figure 5.1. Construction of the recombinant plasmids pBAS01, pBAS02 and pBAS03, derived from the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZαA, containing *MFαI*, including the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site fused in frame to *entL50A* and/or *entL50B* structural genes, and under control of P_{AOX1} . Size of plasmids are given in base pairs. Only relevant restriction enzymes sites are given. 5' *AOX1*, promoter region; *AOX1* TT, transcription termination; P_{TEF1} , transcription elongation factor 1 that drives expression of the *Sh ble* gene in *Pichia*; P_{EM7} , constitutive promoter that drives expression of the *Sh ble* gene in *E. coli*; *Zeo*, zeocin resistance gene (*Sh ble* gene); *CYC1* TT, transcription termination; pUC ori, maintenance and high copy replication in *E. coli*; *entL50A*, structural gene of EntL50A; *entL50B*, structural gene of EntL50B; P_{LAC} , constitutive promoter that drives expression of the *lacZ* gene in *E. coli*; *f1* ori, rescue of single-stranded DNA; *Kan*, kanamycin resistance gene; *Amp*, ampicillin resistance gene.

E. coli High Efficiency JM109 competent cells, and the resulting transformants were confirmed by: (i) plasmid isolation and digestion with *XbaI* and *SalI*; and (ii) PCR amplification of a 1,030-bp fragment (fragment α-L50A-α-L50B) using the pPICZαA specific primer pairs 5AOX1 and 3AOX1, and *E. coli* single colonies as DNA templates. Confirmation of the correct nucleotide sequence of pBAS03 was performed as described above. Finally, pBAS03, previously linearized with *SacI*, was subsequently transformed into *Pc. pastoris* X-33 competent cells as described above, generating *Pc. pastoris* X-33AB transformants. The plasmid pPICZαA, lacking the bacteriocin structural genes, was also transformed in *Pc. pastoris* X-33 competent cells, and the resulting *Pc. pastoris* X-33C strain was used as a control. Primers used for PCR amplification of fragments FA, FB, α-L50B, α-L50A-α-L50B,

entL50A and *entL50B* were designed from the published nucleotide sequence of the EntL50 (EntL50A and EntL50B) operon (Cintas *et al.*, 1998a), and the plasmid pPICZ α A (Invitrogen).

The presence of the integrated pBAS01, pBAS02 and pBAS03 genes in *Pc. pastoris* X-33A, *Pc. pastoris* X-33B and *Pc. pastoris* X-33AB transformants, respectively, was confirmed by PCR amplification using the *entL50A* and *entL50B* specific primer pairs L50A3-L50A4 and L50B3-L50B4, and the pPICZ α A specific primer pairs 5AOX1 and 3AOX1, respectively. Likewise, the presence of pPICZ α A in *Pc. pastoris* X-33C was confirmed by PCR with the pPICZ α A specific primer pairs 5AOX1 and 3AOX1. Total genomic DNA from *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02), *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03), and *Pc. pastoris* X-33C (pPICZ α A) transformants was used as template for PCR amplifications.

V.3.4. Detection and quantification of enterocins L50A and L50B heterologous production by microbiological and immunochemical assays

The direct antimicrobial activity of cultures from several clones of the *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03) transformants was screened by a SPAT essentially as previously described (Cintas *et al.*, 1995), using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. Briefly, yeast transformants were grown in YPD plates supplemented with Zeo (100 μ g/ml) at 30°C for 48 h. Subsequently, these yeast transformants were spotted onto buffered methanol-complex medium BMMY plates, and incubated at 30°C for two to five days. During the incubation, methanol was daily added to attain a 0.5% final concentration to maintain the induction. Then, 40 ml of MRS soft agar containing about 1×10^5 CFU/ml of the indicator microorganism *P. damnosus* CECT4797 was poured over the plates. After further incubation for 16 h, the direct antimicrobial activity was detected by the presence of growth inhibition zones of the indicator microorganism around the spotted producer strain.

In order to determine bacteriocin production kinetics, selected clones from *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02), and *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03) transformants were precultured in buffered glycerol complex medium BMGY at 30°C with shaking until the cultures reached an optical density between 2–6 measured at 600 nm (OD_{600}). Subsequently, cells were harvested by centrifugation ($5,000 \times g$ at 4°C for 10 min), washed with BMGY (without glycerol), and resuspended, to an OD_{600} of 1, in buffered methanol-complex medium BMMY, and in buffered methanol-minimal medium BMM. These yeast transformants were grown, in both media, at 30°C for nine days with shaking, and yeast growth (OD_{600}), CDW, bacteriocin activity, and enterocin concentration were determined periodically by duplicate. Cell-free culture supernatants were obtained by centrifugation ($12,000 \times g$ at 4°C for 10 min), pH-adjustment to 6.2 with 1 M NaOH, and filter-sterilization through 0.22 μ m-pore-size filters (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Subsequently, aliquots of the supernatants were stored at –20°C until use. For determination and quantification of bacteriocin activity, supernatants were analyzed by an agar well-diffusion test (ADT) (Cintas *et al.*,

1995; Basanta *et al.*, 2008a), and a microtiter plate assay (MPA) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000d; Basanta *et al.*, 2008a), respectively, using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. In the MPA, one bacteriocin unit (BU) was defined as the highest dilution of the supernatant causing 50% growth inhibition. In the microbiological assays described above, *Pc. pastoris* X-33C (pPICZ α A) cells, lacking the bacteriocin structural genes, were used as negative controls.

For quantification of EntL50A and EntL50B heterologous production in the supernatants of the recombinant yeasts, a NCI-ELISA was performed essentially as previously described (Gutiérrez *et al.*, 2004; Criado *et al.*, 2006b; Basanta *et al.*, 2008b), using rabbit polyclonal antibodies with specificity for EntL50A (anti-LR1-KLH), and EntL50B (anti-LR2-KLH) (Criado *et al.*, 2006b). Briefly, wells of flat-bottom polystyrene microtiter plates (Maxisorp, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight (4°C) with culture supernatants of the selected clones *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03). After coating, wells were blocked and then washed. Next, diluted anti-LR1-KLH and/or anti-LR2-KLH serums, respectively, were added to each well, unbound antibodies were removed by washing, and goat anti-rabbit immunoglobulin G-peroxidase conjugate (Cappel Laboratories, West Chester, Pa.) was added. The amount of bound peroxidase was determined using ABTS (2,2-azino-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]) (Sigma-Aldrich) as the substrate by measuring the absorbance of the wells at 405 nm with a Labsystems iEMS reader MF (Helsinki, Finland) with a built-in software package for data analysis. The ELISA plates included control wells coated with (i) 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) (coating buffer [CB])-MRS, CB-BMMY and CB-BMM broth to set the background level of the plate; and (ii) six twofold dilutions of samples containing known concentrations of pure EntL50A and EntL50B (determined from the A_{280} using the molar extinction coefficient) in CB-MRS, CB-BMMY and CB-BMM broth to set a standard curves within each plate. In the immunochemical assays described above, supernatants from *Pc. pastoris* X-33C (pPICZ α A), lacking the bacteriocin structural genes, were used as negative controls.

To measure the synergistic activity of heterologously produced EntL50A and EntL50B, supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) strains were challenged against *P. damnosus* CECT4797, separately and combined to achieve a 1:1 enterocin ratio, by a SPAT, and an MPA.

V.3.5. Purification and mass spectrometry analysis of recombinant enterocins L50A and L50B

EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively, were purified essentially as previously described by Cintas *et al.* (1995). Briefly, yeast precultures, grown in BMGY broth at 30°C, were inoculated in 400 ml BMMY broth, which was further grown at 30°C with shaking until maximum concentration of EntL50A and a similar concentration of EntL50B were achieved (approximately 192 and 48 h, respectively). After removing the cells by centrifugation ($12,000 \times g$ at 4°C for 30 min), the cell-free supernatants were subjected to precipitation with ammonium sulfate (50%, wt/vol) (Merck), and

subsequently desalted by gel filtration (PD-10 columns). The obtained fractions were further subjected to cation-exchange (SP Sepharose Fast Flow), and hydrophobic-interaction (Octyl Sepharose CL-4B) chromatographies, followed by reversed-phase chromatography (PepRPC HR 5/5) in a fast-protein liquid chromatography system (FPLC) (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, Spain). The bacteriocins were eluted from the column with a 105 min linear gradient of 15–50% (vol/vol) 2-propanol (Merck) in aqueous 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid (TFA) (Panreac) at a flow rate of 0.5 ml/min. During the purification process, the antimicrobial activity of the fractions obtained was determined by an MPA, using *P. damnosus* CECT4797 as indicator microorganism. Fractions displaying a high and specific bacteriocin activity were pulled together and rechromatographed on the same reversed-phase column until chromatographically pure bacteriocins were obtained, that were stored in 2-propanol containing 0.1% (vol/vol) TFA at –20°C. Concentration of EntL50A and EntL50B in the supernatants and the fractions obtained during the purification procedure was determined by the NCI-ELISA. Furthermore, purified EntL50A and EntL50B were subjected to mass spectrum analysis by using a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight Voyager-DE STR mass spectrometer (MALDI-TOF MS) (PerSeptive Biosystems, Foster City, Calif.) at the Mass Spectrum Service of the Centro de Genómica y Proteómica (Madrid, Spain).

V.3.6. Tricine-SDS-PAGE, Western blotting, and gel overlay assay

FPLC-purified EntL50A and EntL50B were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis on 16% (wt/vol) Tricine gels (Tricine-SDS-PAGE) (Schägger and von Jagow, 1987; Basanta *et al.*, 2008b) and silver staining. Western blotting using anti-LR1-KLH (specific for EntL50A) and anti-LR2-KLH (specific for EntL50B) antibodies were performed essentially as previously described by Gutiérrez *et al.* (2004) and Basanta *et al.* (2008b). To determine the antimicrobial activity of the purified heterologously produced EntL50A and EntL50B, a gel overlay assay (Bhunja *et al.*, 1987; Basanta *et al.*, 2008b) was performed using *P. damnosus* CECT4797 (*ca.*, 1×10^5 CFU/ml) as indicator microorganism.

V.4. RESULTS

V.4.1. Construction of recombinant plasmids for production of enterocins L50A and L50B, separately and together, in *Pichia pastoris*

The recombinant plasmids pBAS01, pBAS02 and pBAS03, derived from the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ α A, were constructed as outlined in Fig. 5.1 A 164-bp and 148-bp *Xho*I-*Xba*I cleaved fragments (fragments L50A and L50B, respectively), containing the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site (AAAAGA) of *MF α 1_s* of *Sc. cerevisiae*, required for processing of the fusion protein during secretion, fused in frame to *entL50A* and *entL50B* from *E. faecium* L50, were obtained of plasmids pTBS02 and pTBS03, respectively. These fragments were

successfully inserted into the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ α A in frame to *MF α I_s*, resulting in the recombinant plasmids pBAS01 and pBAS02, respectively, intended for the expression of both native bacteriocin structural genes, without additional amino acids at their N-termini, under control of methanol-inducible alcohol oxidase promoter (P_{AOX1}). By using a similar approach, a 427-bp *XbaI-SalI* cleaved fragment α -L50B, carrying *MF α I_s* fused in frame to *entL50B*, was cloned downstream of fragment L50A into plasmid pBAS01 resulting in the recombinant plasmid pBAS03, intended for high level inducible expression of *entL50A* and *entL50B* under control of P_{AOX1} without additional amino acids at their N-termini (Fig. 5.1). The correct construction of recombinant plasmids pBAS01, pBAS02 and pBAS03 was verified by: (i) PCR amplification; (ii) plasmid isolation and subsequent digestion with *XhoI-XbaI*, or *XbaI-SalI*; and (iii) DNA sequencing (results not shown). The recombinant plasmids pBAS01, pBAS02 and pBAS03, as well as the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ α A, were linearized with *SacI*, electroporated into *Pc. pastoris* X-33 competent cells, and transformants selected on YPD plates with Zeo (100 μ g/ml), and sorbitol (1 M). Furthermore, the presence of *entL50A*, *entL50B*, and *entL50A* and *entL50B* integrated in the chromosome of *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03), respectively, was confirmed by PCR (results not shown).

V.4.2. Heterologous expression and secretion of biologically active enterocins L50A and L50B, separately and together, by *Pichia pastoris*

The heterologous production of EntL50A and/or EntL50B by transformant yeasts was detected and quantified by both microbiological and immunochemical assays. As shown Fig. 5.2, *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03) transformants showed antimicrobial activity by SPAT, while the control strain *Pc. pastoris* X-33C (pPICZ α A), did not display any antagonistic effect under similar conditions.

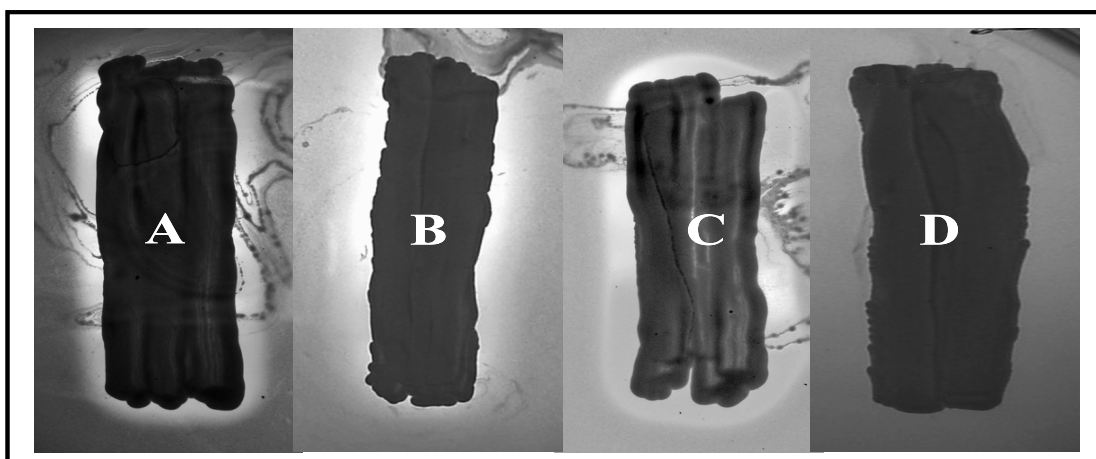


Figure 5.2. Direct antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (spot A), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (spot B), *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (spot C), and *Pc. pastoris* X-33C (pPICZ α A) (spot D), grown in BMMY broth at 30°C after five days of incubation, as determined by a SPAT using *P. damnosus* CECT4797 the indicator microorganism.

To evaluate recombinant production of EntL50A and EntL50B, separately and together, several *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03) transformants were grown in BMMY and BMM broth at 30°C for nine days, and supernatants were periodically withdrawn to test their antimicrobial activity by an ADT and an MPA (Fig. 5.3; Table V.3). By using both assays, extracellular antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03) transformants grown in BMMY and BMM was detected. It is pertinent to note that no antimicrobial activity was found in supernatants from *Pc. pastoris* X-33C (pPICZ α A), lacking the bacteriocin structural genes, grown in BMMY and BMM broth (Fig. 5.3), which ruled out the possibility of the extracellular antimicrobial activity exerted from *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03) transformants is caused by metabolites other than bacteriocins. Then, the *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) transformants were selected for further microbiological and immunochemical quantification of recombinant EntL50A and/or EntL50B production, respectively, in the complex and minimal media BMMY and BMM, respectively (Fig. 5.3; Table V.3). In BMMY, yeast growth was faster than in BMM and a higher cell density was reached (OD₆₀₀ of 9.2–10.9 compared to OD₆₀₀ of 8.2–8.6 in BMM). The antimicrobial activity of supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) was higher in cultures grown in the minimal medium BMM than in the complex medium BMMY, whereas the opposite was observed for those from *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02). The antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) was firstly detected after 24 h of incubation, and the maximum values achieved after incubation for 192 h (310 and 100 BU/mgCDW in BMM and BMMY, respectively). The antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) was firstly detected after 48 h of incubation, and the maximum values, which were smaller than those of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), were found after 120 and 144 h of incubation (50 and 95 BU/mgCDW in BMM and BMMY, respectively). The antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33AB-27 was firstly detected after 24 h of incubation, and the maximum values were found after 96 and 48 h of incubation (65 and 20 BU/mgCDW in BMM and BMMY, respectively). In both media, the antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33AB-27 was smaller than that of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01). However, the antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33AB-27 in BMM and BMMY was higher and lower, respectively, than that of *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02). Likewise, the maximum antimicrobial activity (expressed as BU/ml) of supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) was also found after incubation for 192 h (1,600 and 910 BU/ml in BMM and BMMY, respectively), 120 and 144 h (150 and 600 BU/ml in BMM and BMMY, respectively), and 96 and 48 h (180 and 90 BU/ml in BMM and BMMY, respectively), respectively (results not shown).

Table V.3. Production and antimicrobial activity of EntL50A and/or EntL50B from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) recombinant strains, respectively, grown in the minimal and complex media BMM and BMMY, respectively

Medium and incubation time (h)	<i>Pc. pastoris</i> X-33A-22 (pBAS01)						<i>Pc. pastoris</i> X-33B-33 (pBAS02)						<i>Pc. pastoris</i> X-33AB-27 (pBAS03)					
	OD ₆₀₀ ^a	EntL50A concn ^b		Antimicrobial activity		SAA ^c (BU/ng EntL50A)	OD ₆₀₀	EntL50B concn ^b		Antimicrobial activity		SAA ^c (BU/ng EntL50B)	OD ₆₀₀	Concn ^b (ng/mgCDW)		Antimicrobial activity		
		ng/ml	ng/mg CDW	ADT ^c (mm)	MPA ^d (BU/mg CDW)			ng/ml	ng/mg CDW	ADT (mm)	MPA (BU/mg CDW)			Ent L50A	Ent L50B	ADT (mm)	MPA (BU/mg CDW)	
BMM																		
0	1.0	NB	NB	NIZD	NID	NE	1.0	NB	NB	NIZD	NID	NE	1.0	NB	NB	NIZD	NID	
8	2.3	13	14.5	NIZD	NID	NE	2.4	70	70	NIZD	NID	NE	2.6	9.7	10.5	NIZD	NID	
24	2.5	50	45.5	11.5 n2	60	1.3	2.5	365	340	NIZD	NID	NE	2.6	24.0	32.1	11.0 n2	40	
48	3.4	100	56.0	14.7 n2	115	2.1	3.2	560	350	8.0 D	NID	NE	3.7	29.0	37.7	13.1 n2	45	
72	4.6	165	62.0	15.1 n2	130	2.1	3.6	750	390	11.3 n	40	0.10	4.5	30.0	39.3	13.6 n2	60	
96	5.3	225	70.5	15.8 n2	150	2.1	4.6	1,160	430	12.2 n2	45	0.10	5.3	32.8	28.4	14.1 n2	65	
120	5.7	295	84.5	16.0 n2	160	1.9	4.8	1,425	475	12.8 n2	50	0.10	5.6	29.2	18.9	13.4 n2	55	
144	6.3	355	89.0	16.4 n2	175	2.0	5.5	1,375	405	11.1 n2	30	0.07	6.2	20.1	7.1	13.2 n2	40	
168	6.9	565	125.5	16.7 n2	190	1.5	6.3	1,340	335	10.3 n	15	0.04	6.5	18.6	5.8	12.0 n2	30	
192	7.8	1,180	228.5	17.6 n2	310	1.4	7.4	995	205	9.6 n-	10	0.05	8.3	11.3	1.0	11.8 n2	25	
216	8.6	935	161.5	17.0 n2	205	1.3	8.4	1,150	205	9.1 n-	10	0.05	8.2	9.1	1.1	11.5 n2	20	
BMMY																		
0	1.0	NB	NB	NIZD	NID	NE	1.0	NB	NB	NIZD	NID	NE	1.0	NB	NB	NIZD	NID	
8	3.5	14	5.0	NIZD	NID	NE	3.4	65	25	NIZD	NID	NE	3.7	2.4	4.5	NIZD	NID	
24	4.7	29	7.5	10.2 n	NID	NE	4.5	185	50	NIZD	NID	NE	4.9	2.5	5.1	10.7 n2	10	
48	5.2	55	12.5	11.7 n2	10	0.8	5.2	310	70	8.5 D	NID	NE	5.3	3.0	5.9	14.1 n2	20	
72	6.3	85	15.5	12.7 n2	25	1.6	5.8	545	110	9.1 D	10	0.09	6.1	2.9	5.4	11.4 n2	10	
96	6.8	95	16.5	13.3 n2	30	1.8	6.2	910	170	9.5 D	10	0.05	7.1	2.2	4.7	11.2 n2	10	
120	8.2	135	18.5	13.7 n2	50	2.7	6.9	4,165	695	11.4 n	45	0.06	7.7	2.1	4.1	11.0 n2	10	
144	9.3	170	21.0	13.9 n2	55	2.6	7.2	7,810	1,240	14.0 n2	95	0.08	7.9	2.0	4.0	10.8 n2	10	
168	9.5	210	25.0	14.2 n2	70	2.8	7.8	6,490	950	13.0 n	70	0.08	8.0	1.4	1.7	10.6 n2	10	
192	10.2	282	31.0	15.8 n2	100	3.2	9.0	4,095	515	12.5 n	45	0.09	8.6	0.4	0.2	10.5 n2	10	
216	10.9	115	12.0	13.3 n2	15	1.2	9.8	3,610	415	12.1 n	40	0.09	9.2	0.3	0.1	10.0 n2	10	

^aOD₆₀₀, optical density of the culture at 600 nm.^bEntL50A and EntL50B concentration calculated by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for EntL50A and EntL50B, and expressed as ng/ml and ng/mgCDW. NB, no bacteriocin detected.^cAntimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 as determined by an ADT. Inhibition zones are differentiated as follows: D= diffuse, n= slightly nitide, n= nitide, n2= extremely nitide. NIZD, no inhibition zone detected using 50 µl of supernatant.^dAntimicrobial activity against *P. damnosus* CECT4797 as determined by an MPA. NID, no inhibition detected using 100 µl of supernatant.^eSpecific antimicrobial activity refers to the antimicrobial activity (BU/mgCDW), calculated by an MPA, divided by the EntL50A or EntL50B concentration (ng/mgCDW). NE, not evaluable.

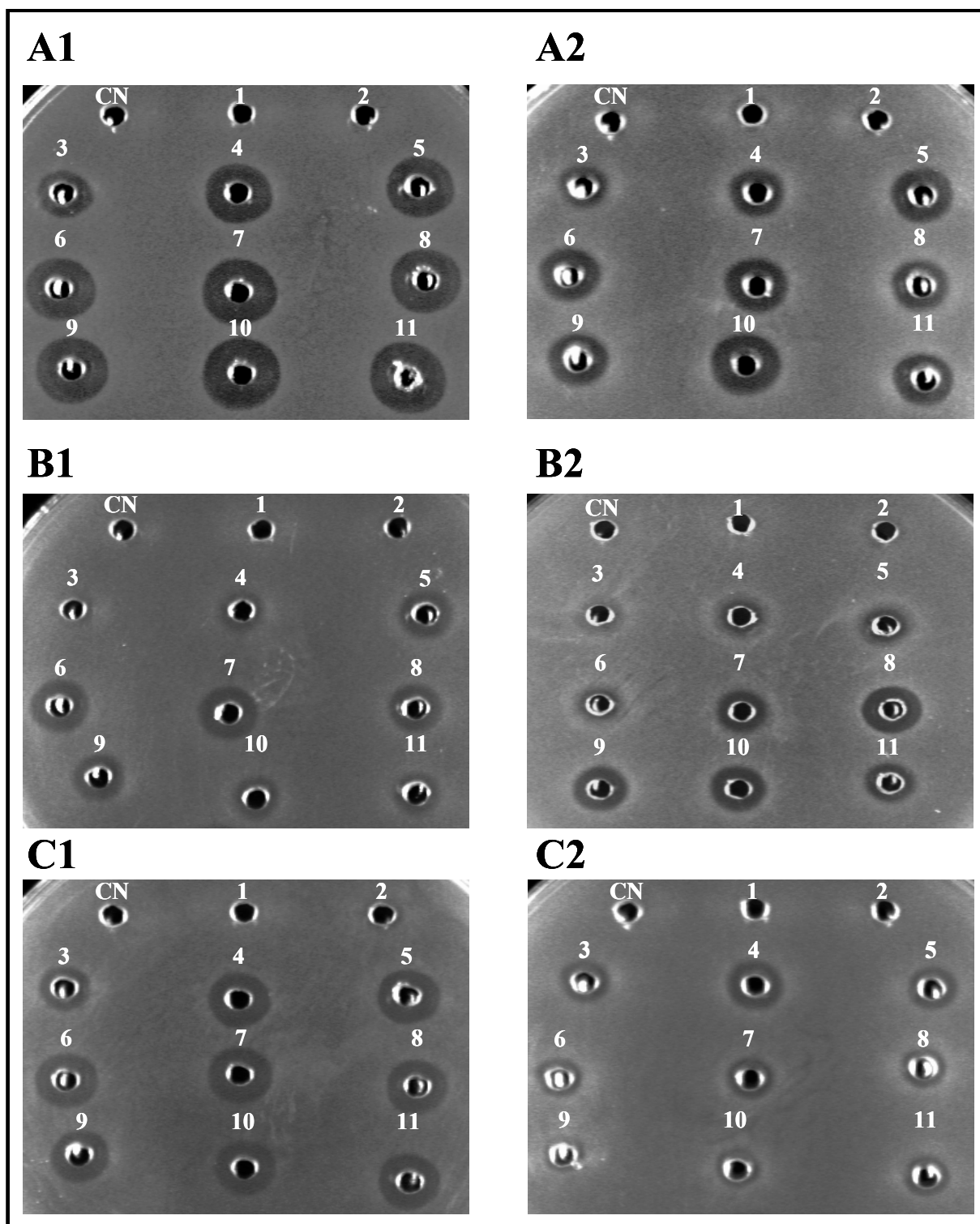


Figure 5.3. Antimicrobial activity of supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) cultures grown in BMM (A1, B1 and C1, respectively) and BMMY (A2, B2 and C2, respectively) broth at 30°C against *P. damnosus* CECT4797 as determined by an ADT. Supernatants were obtained after incubation of cultures for 0 (1), 8 (2), 24 (3), 48 (4), 72 (5), 96 (6), 120 (7), 144 (8), 168 (9), 192 (10), and 216 (11) h. Supernatants from *Pc. pastoris* X-33C (pPICZαA) cultures grown in BMM and BMMY broth at 30°C after 216 h (CN) were used as negative control.

The heterologous production of EntL50A, EntL50B, and EntL50A and EntL50B by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03), respectively, was further quantified using specific anti-LRI-KLH (for EntL50A), and anti-LR2-KLH (for EntL50B) antibodies in an NCI-ELISA. By using this immunochemical approach, the presence of the recombinant bacteriocins in supernatants from the corresponding transformants and their absence in equivalent samples from the negative control strain *Pc. pastoris* X-33C (pPICZ α A) was undoubtedly demonstrated. For all the recombinant strains, bacteriocin production in both media started immediately after induction of gene expression with methanol and was parallel to cell growth. On the other hand, the maximum EntL50A concentrations were found at the beginning of the stationary growth phase of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) cultures, while the maximum concentrations of EntL50B, and EntL50A and EntL50B were achieved during the exponential growth phase of *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) cultures, respectively (Table V.3). Similarly as described above for the antimicrobial activity, the maximum concentration of EntL50A, and EntL50A and EntL50B in supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03), respectively, was higher when cultures were grown in the minimal medium BMM than when cultivated in the complex medium BMMY, whereas the maximum concentration of EntL50B in supernatants from *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) was higher in the complex medium BMMY (Table V.3). In this respect, the maximum amount of EntL50A produced by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) was found after 192 h of incubation (228.5 and 31 ng/mgCDW in BMM and BMMY, respectively); the maximum amount of EntL50A produced by *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) was found after 96 and 48 h of incubation (32.8 and 3.0 ng/mgCDW in BMM and BMMY, respectively), and the maximum amount of EntL50B produced by *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) was found after 72 and 48 h of incubation (39.3 and 5.9 ng/mgCDW in BMM and BMMY, respectively). However, the maximum amount of EntL50B produced by *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) was quantified after 120 and 144 h of incubation (475 and 1,240 ng/mgCDW in BMM and BMMY, respectively). Likewise, the maximum concentration (expressed as ng/ml) of EntL50A, EntL50B, and EntL50A and EntL50B from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03), respectively, was also found after incubation for 192 h (1,180 and 282 ng/ml in BMM and BMMY, respectively), 120 and 144 h (1,425 and 7,810 ng/ml in BMM and BMMY, respectively), and between 48–96 h (90 and 13.5 ng/ml of EntL50A, and 103 and 26.5 ng/ml of EntL50B in BMM and BMMY, respectively) (results not shown). Moreover, it is interesting to note that the maximum specific activity of EntL50A in supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) was 2.1 and 3.2 BU/ngEntL50A in BMM and BMMY, respectively, while that of EntL50B in supernatants from *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) was only 0.10 and 0.09 BU/ngEntL50B in BMM and BMMY, respectively.

Interestingly, the maximum antimicrobial activity of supernatants from *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) was found in supernatants containing both bacteriocins at an approximately 1:1 ratio, and it was higher than that of supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) containing similar amounts of EntL50A and EntL50B, respectively (Table V.3), suggesting

that the recombinant bacteriocins act synergistically. To further confirm and quantify the possible synergistic effect of these recombinant bacteriocins, supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) cultures with known bacteriocin concentrations were challenged against *P. damnosus* CECT4797, independently and mixed in a 1:1 bacteriocin ratio, by an SPAT and an MPA. The results demonstrated that the recombinant EntL50A and EntL50B together possess a greater antimicrobial activity (1,707 and 143 BU/mgCDW in BMM and BMMY, respectively) than that exerted by EntL50A and EntL50B acting independently (316 and 0 BU/mgCDW, and 35 and 16 BU/mgCDW in BMM and BMMY, respectively), being this synergism degree was quantified as approximately 5.4 and 2.8 times in BMM and BMMY, respectively (results not shown).

V.4.3. Purification and characterization of enterocins L50A and L50B heterologously produced by *Pichia pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively

In order to achieve the maximum concentration of recombinant EntL50A in the complex medium BMMY and a similar concentration of recombinant EntL50B, *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) were precultured in BMGY broth at 30°C, and subsequently grown in BMMY at 30°C with shaking accordingly to data shown in Table V.3 (*ca.*, 192 and 48 h, respectively). The results of the purification of the recombinant bacteriocins are summarized in Table V.4. Ammonium sulfate precipitation of proteins in culture supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) allowed a recovery of 65 and 68% of the EntL50A and EntL50B initially found in culture supernatants, as determined by an NCI-ELISA, and an increase in specific antimicrobial activity of 14- and 27-fold, respectively. Moreover, the antimicrobial activity of these fractions represented a 129 and 250% of that in culture supernatants, respectively. These fractions were further desalted by gel filtration, which allowed a recovery of 60 and 64% of the initial EntL50A and EntL50B, and an increase in specific antimicrobial activity of 24- and 12-fold, respectively. Besides, the fractions eluted from the hydrophobic-interaction columns represented a 239- and 48-fold increase in specific antimicrobial activity, and a recovery of 41 and 33% of the initial EntL50A and EntL50B, respectively. The last reversed-phase FPLC purification step resulted, in both cases, in a major absorbance peak coincident with the antimicrobial activity peak, which eluted at 28.5 and 30% (vol/vol) 2-propanol in aqueous 0.1% (vol/vol) TFA, respectively (results not shown). The concentration of EntL50A and EntL50B in these fractions was 24 and 6.5 µg, and showed a 43 and 5% of the antimicrobial activity found in culture supernatants, respectively, with an 154- and 161-fold increase in specific antimicrobial activity. The purity and molecular mass of recombinant EntL50A and EntL50B in fractions from the last reversed-phase FPLC were further evaluated by MALDI-TOF MS. The results obtained for recombinant EntL50A showed a minor peptide with a molecular mass similar to that of natural EntL50A (5,188 Da) (Fig. 5.4.A), as well as multiple chromatographic peaks with molecular masses ranging from 6.2 to 6.9 kDa, as well as, while those for recombinant EntL50B showed a major peptide with a molecular mass identical to that of natural EntL50B (5,178 Da) (Cintas *et al.*, 1998a), as well as a second major peptide with a molecular mass of 5,194 Da (Fig. 5.4.B).

Table V.4. Purification of recombinant EntL50A and EntL50B produced by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively, grown in BMMY at 30°C

Purification stage	Volume (ml)	Total A_{254} ^a	Total activity (10 ³ BU) ^b	Sp act (BU/ A_{254}) ^c	Increase in sp act (fold) ^d	Total activity (%)	Enterocin yield (ng) ^e	Enterocin yield (%)	Enterocin sp act (BU/ng) ^f
<i>Pc. pastoris</i> X-33A-22 (pBAS01)									
Culture supernatant	400	320.8	670	2,088	1	100	114,500	100	5.9
Ammonium sulfate precipitation	40	29.2	865	29,623	14	129	74,100	65	11.7
Gel filtration chromatography	80	10.9	550	50,459	24	82	68,000	60	8.1
Cation-exchange chromatography	50	2.3	490	213,043	102	73	57,300	50	8.6
Hydrophobic-interaction chromatography	10	0.9	450	500,000	239	67	46,200	41	9.7
Reversed-phase chromatography	3.5	0.9	290	322,222	154	43	24,000	21	12.1
<i>Pc. pastoris</i> X-33B-33 (pBAS02)									
Culture supernatant	400	321.2	40	124	1	100	89,600	100	0.4
Ammonium sulfate precipitation	40	29.3	100	3,413	27	250	60,900	68	1.6
Gel filtration chromatography	80	15.2	24	1,579	12	60	57,300	64	0.4
Cation-exchange chromatography	50	2.1	3	1,429	12	7.5	49,300	55	0.06
Hydrophobic-interaction chromatography	10	1.0	6	6,000	48	15	29,600	33	0.2
Reversed-phase chromatography	1.6	0.1	2	20,000	161	5	6,500	7.2	0.3

^aAbsorbance at 254 nm multiplied by the volume in milliliters.

^bAntimicrobial activity in bacteriocin units per milliliter (BU/ml) as determined by an MPA multiplied by the total volume.

^cSpecific activity expressed as the total activity (BU) divided by the total A_{254} .

^dThe specific activity of a fraction (BU/ A_{254}) divided by the specific activity of the culture supernatant (BU/ A_{254}).

^eEntL50A and EntL50B concentration as determined by an NCI-ELISA using specific polyclonal antibodies for EntL50A or EntL50B.

^fSpecific activity expressed as the total activity (BU) divided by the enterocin yield (ng).

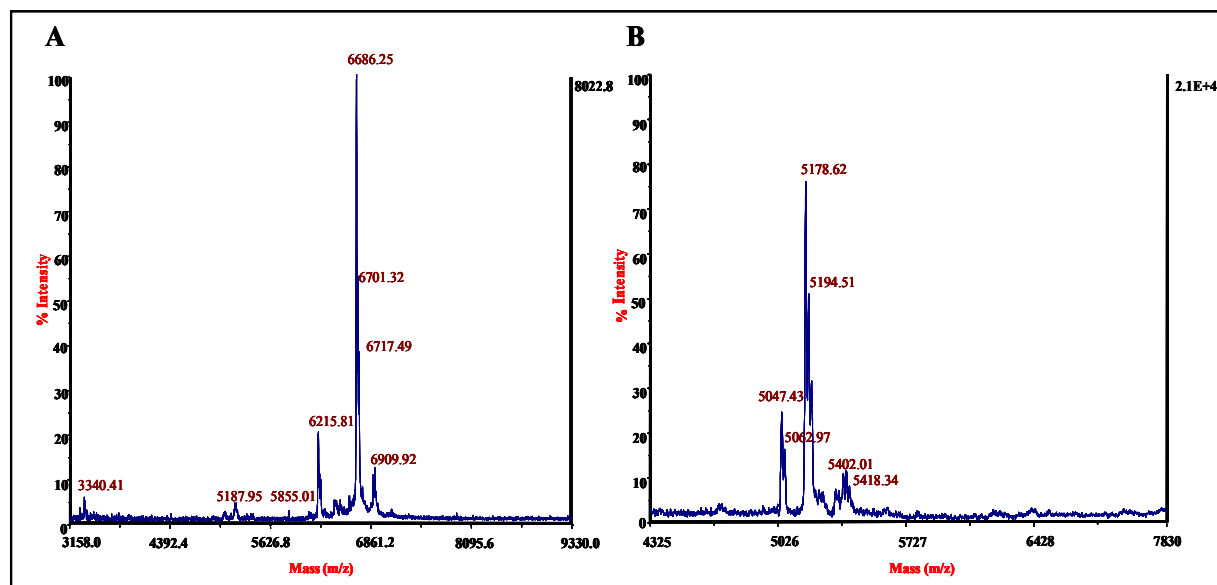


Figure 5.4. Mass spectrometry analysis of recombinant EntL50A (A) and EntL50B (B) purified from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) cultures, respectively, grown in BMMY broth at 30°C.

Recombinant EntL50A and EntL50B were also analyzed on a silver-stained Tricine-SDS-PAGE gels (Fig. 5.5.A), revealing one major band of the expected size in the gel slots containing each bacteriocin peptide, as well as, in the case of EntL50B, one upper band, thus suggesting that this recombinant peptide displays a strong tendency to form aggregates. The peptides and peptide aggregates were also detected by Western blotting using the anti-LR1-KLH and anti-LR2-KLH antibodies specific to EntL50A and EntL50B, respectively (Fig. 5.5.B), and recombinant EntL50A and EntL50B were shown to be biologically active by an overlay assay (Fig. 5.5.C).

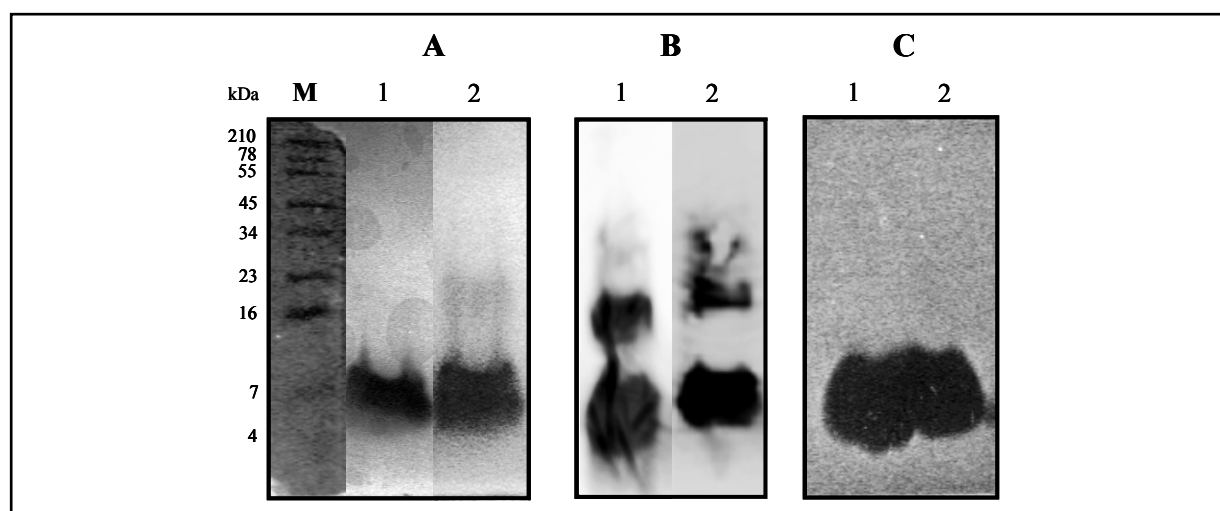


Figure 5.5. (A) Tricine-SDS-PAGE of purified EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively, after silver staining. (B) Western blotting using rabbit polyclonal antibodies with specificity for EntL50A (anti-LR1-KLH) and EntL50B (anti-LR2-KLH). (C) Antimicrobial activity after gel overlay with the indicator strain *P. damnosus* CECT4797. Lane 1, purified EntL50A; lane 2, purified EntL50B. The positions of SeeBlue® Pre-Stained Standard molecular mass markers (M) (Invitrogen) are indicated on the left.

V.5. DISCUSSION

During the last years, production of LAB bacteriocins, such as PedPA-1, EntA, EntP and EntAS-48, by heterologous hosts, mostly food-grade LAB, has been addressed to overcome certain concerns about the potential application of bacteriocins and bacteriocinogenic strains as food biopreservatives, mainly bacteriocin production levels and safety aspects of the bacteriocin producer (GRAS and QPS *status*). Unfortunately, low production yields of recombinant bacteriocins by LAB has been the norm rather than the exception (Gutiérrez *et al.*, 2005b; O’Keeffe *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000b, Fernández *et al.*, 2007). In spite of the wide exploitation of yeasts as cell factories for production of a variety of foreign proteins, these hosts have not been yet fully exploited as alternative hosts for production of bacteriocins. To our best knowledge, bacteriocin secretion by *Sc. cerevisiae* has only been described for the class IIa bacteriocins PedPA-1 from *P. acidilactici* PAC1.0 and plantaricin 423 (Plt423) from *Lactobacillus plantarum* 423 (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003), and, very recently, for the two-leader-less peptide bacteriocin EntL50 (EntL50A and EntL50B) from *E. faecium* L50 (Basanta *et al.*, 2008b). Strikingly, no bacteriocin activity could be detected in non concentrated supernatants from the recombinant yeasts heterologously producing PedPA-1 or Plt423 (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003); however, the supernatants from the *Sc. cerevisiae* recombinant strains producing EntL50A or EntL50B displayed antimicrobial activity, although bacteriocins were produced at levels lower than those of the wild-type producer strain and simultaneous production of both peptides by a single yeast strain was unsuccessful (Basanta *et al.*, 2008b). The low levels of bacteriocin production by *Sc. cerevisiae* reported in these studies agree with previous results showing the lower secretory capacity of *Sc. cerevisiae* as compared to other yeasts such as *Pc. pastoris* (Hollenberg and Gellissen, 1997; Muller *et al.*, 1998; Cereghino and Cregg, 1999; Cereghino *et al.*, 2001, 2002; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a).

In the present work we describe for the first time the heterologous expression and secretion of a non pediocin-like bacteriocin by *Pc. pastoris*. For this purpose, the *Pc. pastoris* expression and secretion vector pPICZ α A was selected, as it contains three important elements for successful heterologous expression: (i) the P_{AOX1}; (ii) the MF α 1_s, including the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site (AAAAGA) required for processing of fusion proteins during MF α 1_s-directed secretion through the Sec system; and (iii) the *AOX1* gene that drives the integration of this vector into the *Pc. pastoris* genome, and thus maximize the stability of foreign protein production and/or allow the generation of multicopy strains (Brake *et al.*, 1984; Cregg *et al.*, 1993; Cereghino and Cregg, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005a). The alcohol oxidase enzyme (AOX) is encoded by two genes, *AOX1* and *AOX2*, but the former is responsible for the majority of AOX activity in the cell. Moreover, P_{AOX1} is a strong and tightly regulated promoter inducible by methanol that drives high-level expression of *AOX1*, yielding AOX levels that constitute more than 30% of the total soluble yeast protein (Cereghino and Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). On the other hand, MF α 1_s is the classical and most widely used secretion signal, being usually more effective than the native signal sequences (Cereghino and Cregg, 2000), and performing very efficiently especially for the secretion of small-

sized products (Sreekrishna *et al.*, 1997). Although retaining the Glu-Ala spacers adjacent to the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site is prudent when fusing proteins to MF α 1_s (Sreekrishna *et al.*, 1997), these repeats were not included in this study since a high-level efficient secretion using directly the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site has been already demonstrated (Brake *et al.*, 1984). In our work, the vector pPICZ α A was successfully used for the generation of three recombinant plasmids intended for the heterologous production of EntL50A and EntL50B, independently and together, by *Pc. pastoris*. In these recombinant plasmids, *entL50A* and *entL50B* are fused to MF α 1_s, and gene expression is under control of P_{AOX1}. The generated recombinant strains *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) showed bacteriocinogenic activity in both solid and liquid complex and minimal media (BMMY and BMM, respectively), and bacteriocin production was detected and quantified by microbiological and immunochemical assays. Notwithstanding yeast growth was higher in the complex medium BMMY than in the minimal medium BMM, the extracellular antimicrobial activity of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) was much lower, and the recombinant EntL50A, and EntL50A and EntL50B production represented a 14%, and a 9 and 15% of that found in BMM, respectively. These results are in striking contrast to those for *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), whose extracellular antimicrobial activity was higher in the complex medium BMMY, and the recombinant EntL50B concentration was quantified as 2.6-fold higher than that in BMM. At first glance, the lower EntL50A concentration in supernatants from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) cultures grown in BMMY may be ascribed to a higher bacteriocin adsorption to the producer yeast cell surface. In this respect, EntL50A is a cationic peptide (Cintas *et al.*, 1998a) that may adsorb to the negatively charged cell surface in a pH-dependent, reversible phenomenon, being the maximum and minimum adsorption obtained at pH 6.0–7.0 and 2.0–3.0, respectively, as it has been previously shown for other bacteriocins (Klaenhammer, 1988; Ray, 1992; Yang *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 2001; von Mollendorff *et al.*, 2007). Interestingly, the final pH of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) cultures grown in BMMY broth was higher than that in BMM broth (pH 6.0 and pH 4.0, respectively). Besides, hydrophobic proteins or peptides, such as EntL50A and most bacteriocins, are known to interact with the producer cell membranes (Schiffer *et al.*, 1992; Schoeman *et al.*, 1999). In this respect, EntL50A (GRAVY index of 0.202) (Cintas *et al.*, 2000d) would stuck within the yeast cytoplasmic membrane after the initial pH-dependent cell-surface adsorption. Together, these observations led us to speculate that the lower amounts of EntL50A found in BMMY broth may be partially due to a higher bacteriocin adsorption/sticking to the producer yeast cell surface. However, the lower activity in BMMY might be also ascribed to one or more of the following factors: (i) (higher) aggregation of bacteriocin monomers rendering oligomers and/or complexes with medium constituents reducing the antigen epitope recognition (Schoeman *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a; Ilgen *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2006b), and/or (ii) higher susceptibility to C-terminal degradation by neutral proteases, whose concentration in BMMY is higher than in BMM as a result of higher pH and higher cell density and cell lysis (Brey *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2005;

Gutiérrez *et al.*, 2005a; Criado *et al.*, 2006b). Likewise, these differences in protease activity may partially explain the reason why the concentration and biological activity of recombinant EntL50A diminished by a 60 and 85%, respectively, after the maximum values were found in supernatants of cultures grown in BMMY but only by a 30 and 35%, respectively, in those of cultures grown in BMM. It should be acknowledge that *Pc. pastoris* is widely known for its ability to perform many post-translational modifications on secreted proteins such as proteolytic maturation, disulphide bond formation and addition of both *O*-linked and *N*-linked carbohydrate moieties, and as a result of the later event, heterologous secreted glycoproteins may be inactive and/or less active, as well as antigenically distinct from the natural proteins (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1990; Cereghino and Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). However, glycosilation sites are not found within EntL50A molecule, being thus unlikely that qualitative or quantitative differences in glycosilation in BMM and BMMY may account for the described differences in EntL50A production.

Interestingly, the maximum amount of recombinant EntL50B produced by *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) was 1,240 ng/mgCDW (in BMMY at 30°C), which represents a 5.9-fold increase over the maximum EntL50B production by the wild-type strain *E. faecium* L50 (210 ng/mgCDW in MRS broth at 25°C) (Criado *et al.* 2006b). Notwithstanding recombinant EntL50B production by *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) in BMM was lower (475 ng/mgCDW), this bacteriocin concentration still represented a 2.3-fold increase over the maximum production by the wild-type strain. However, the maximum amount of recombinant EntL50A produced by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) was 228.5 ng/mgCDW (in BMM at 30°C), which is closely similar to the maximum EntL50A production by *E. faecium* L50 (217 ng/mgCDW in MRS broth at 25°C) (Criado *et al.* 2006b).

Irrespectively of the culture media, growth of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) was slightly higher than that of *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02); however, the maximum amounts of recombinant EntL50A found in supernatants from cultures of *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) grown in BMM and BMMY were 2- and 40-fold lower, respectively, than those of EntL50B found in supernatants from cultures of *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) grown in the same media. At first glance these differences may be ascribed to higher C-terminal proteolytic degradation of EntL50A, as well as to expression of *entL50B* and/or secretion of EntL50B at higher levels. Respect to the latter possibilities, its is known that *Pc. pastoris* is capable of integrating multiple copies of heterologous DNA via recombination at the *AOX1* locus, which leads to higher gene expression (Sreekrishna *et al.*, 1997; Cereghino and Cregg, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). On the other hand, it has been demonstrated that secretion efficiency depends in part on the nature characteristics of the heterologous protein (Cereghino and Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Cereghino *et al.*, 2002); however, we consider unlikely that this phenomenon is responsible for the differences in EntL50A and EntL50B concentrations found in the respective supernatants since: (i) both bacteriocins are highly-related (72% identity), show similar physico-chemical characteristics, such as molecular weight, charge, pI and hydrophobicity, and share 31 out of 44 and 43 amino acid residues, especially at the N-terminus including the first eight amino acid residues (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d); and (ii) both bacteriocins are produced at similar concentrations by the recombinant yeast strain *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (Table V.3). Moreover, it is widely

known that hydrophobic proteins, such as most bacteriocins, interact with the producer cell membranes (Schiffer *et al.*, 1992; Schoeman *et al.*, 1999). In this respect, EntL50A is more hydrophobic than EntL50B (GRAVY indexes of 0.202 and -0.144 , respectively) (Cintas *et al.*, 2000d), which may result in a higher EntL50A sticking within the yeast cytoplasmic membrane after the initial pH-dependent cell-surface adsorption, which could also partially explain the lower EntL50A concentrations found in the respective supernatants. Independently of the unraveled nature of the mechanism(s) involved in the differences in EntL50A and EntL50B concentrations found in supernatants from *Pc. pastoris* cultures, it should be acknowledged that we have previously reported similar results for the MF α 1_s-directed heterologous secretion of EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* (Basanta *et al.*, 2008b). However, it is interesting to note that intriguing differences in bacteriocin production and specific antimicrobial activities were found when comparing *Pc. pastoris* and *Sc. cerevisiae* as heterologous hosts for the production of EntL50A and EntL50B. In this respect, the maximum concentration of EntL50A and EntL50B in supernatants from *Pc. pastoris* was 27- and 52-fold higher than that in supernatants from *Sc. cerevisiae*, although the corresponding specific antimicrobial activity was 21- and 71-fold lower, which may be partially ascribed to one or more of the following factors: (i) existence of compounds (*i.e.*, salt and/or proteins or collagen-like materials) interfering with bacteriocin activity (Schoeman *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a, b; Ilgen *et al.*, 2005); (ii) (higher)aggregation of bacteriocin monomers rendering less active oligomers and/or complexes with medium constituents (Yang *et al.*, 1992; Criado *et al.*, 2006b), and/or (iii) higher cell density and cell lysis yielding higher bacteriocin proteolytic degradation (Trucksis *et al.*, 1997; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a, b; Criado *et al.*, 2006b; Han *et al.*, 2006).

Contrarily to our previous study in which we reported the unsuccessful co-production of EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* (Basanta *et al.*, 2008b), we succeeded in the development of a *Pc. pastoris* recombinant strain with the ability to produce simultaneously both peptides with antimicrobial activity in BMM and BMMY. However, EntL50A and EntL50B production by *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) was 7–10 and 12–210-fold lower than that by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively. In this respect, it is known that multibacteriocinogenic strains produce bacteriocins at lower concentrations than the respective single-bacteriocin producers (Horn *et al.*, 1998; Criado *et al.*, 2006b; Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007b). Moreover, it is likely that, similarly as discussed above, these differences also reflect a lower copy number of *entL50A* and *entL50B* integrated in *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03). Interestingly, EntL50A and EntL50B are produced at equimolar amounts by *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03), similarly as previously described for the wild-type strain *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b). In this respect, we have shown that EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Pc. pastoris* act synergistically, being the synergistic effect higher when both peptides are mixed in a 1:1 ratio, which is in agreement with previously reported data using either *in vitro* synthesized EntL50A and EntL50B or the peptides heterologously produced by *Sc. cerevisiae* (Cintas *et al.*, 1998a; Basanta *et al.*, 2008a, b).

To date, MF α 1_s-directed bacteriocin secretion by *Pc. pastoris* has only been previously described for three class IIa bacteriocins, namely EntP from *E. faecium* P13 (Gutiérrez *et al.*, 2005a), PedPA-1 from *P. acidilactici* PAC1.0 (Beaulieu *et al.*, 2005) and hiracin JM79 (HirJM79) from *Enterococcus hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2008). In this respect, it was reported that heterologous production of PedPA-1 by *Pc. pastoris* resulted in secretion of recombinant bacteriocin tightly associated with “collagen-like” material and lacking of biological activity. However, in a previous studies we demonstrated the suitability of *Pc. pastoris* for the heterologous production of high levels of biologically actives EntP from *E. faecium* P13 and HirJM79 from *E. hirae* DCH5 in BMM and BMMY (Gutiérrez *et al.*, 2005a; Sánchez *et al.*, 2008). Irrespectively of the growth medium, bacteriocinogenic *Pc. pastoris* strains producing EntP, HirJM79, EntL50A, EntL50B and EntL50A and EntL50B showed similar growth rates; however, the maximum concentrations of EntP and HirJM79 were obtained at the beginning of the exponential growth phase (OD₆₀₀ of 1.7–3.3) while those of EntL50A and EntL50B were found at the beginning of the stationary growth phase (OD₆₀₀ of 7.8–10.2) and the middle-late exponential growth phase (OD₆₀₀ of 4.8–7.2), respectively. Moreover, the concentration and biological activity of EntP and HirJM79 decreased rapidly, and no antimicrobial activity (in BMM), or only at a very low level (1.5 or 45% of the maximum value in BMMY), was found after incubation of cultures for 10 and 12 h, likely due to bacteriocin degradation by neutral proteases (Gutiérrez *et al.*, 2005a; Sánchez *et al.*, 2008a). However, EntL50A and EntL50B showed a higher stability, especially in BMM (see above), being remarkable that bacteriocin concentrations found 24 and 96 h after the maximum values were achieved still represented a 71 and 43%, respectively, and the residual EntL50A and EntL50B showed a 93 and 50% of the specific antimicrobial activity, respectively.

The strategy developed in this work permitted the purification of the highly-related EntL50A and EntL50B showing similar physico-chemical characteristics (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d). Previously, we described the purification of the natural bacteriocin from cultures of the wild-type strain *E. faecium* L50 grown in the complex medium MRS broth by using a similar protocol, but lacking the gel filtration chromatography step; however, the resulting final fraction was shown to contain a mixture of both peptides EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1995, 1998a). In a previous work, EntL50A and EntL50B were purified from culture supernatants from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, grown in the minimal medium SCGR (Basanta *et al.*, 2008b). However, only a 11 and 22% of the initial antimicrobial activity, respectively, was recovered after the ammonium sulfate precipitation step; which could be due to the overall low protein concentration in SCGR and the concomitant reduced bacteriocin co-precipitation, since it is known that during the purification of low molecular weight hydrophobic and/or amphiphilic bacteriocins, such as EntL50 (EntL50A and EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d), bacteriocin molecules easily aggregate with proteinaceous compounds from the medium and/or lysated cells (Cintas *et al.*, 2001). Similarly, we found out the requirement of a gel-filtration step for the further success in the cation-exchange chromatography of the recombinant peptides, which may be explained by the fact that the highly concentrated ammonium cations may compete efficiently with EntL50A and EntL50B and exclude them from the anionic ligands immobilized on the cation-exchanger matrix, especially considering that

they are barely cationic low-molecular weight peptides (Cintas *et al.*, 2000d), and that a low total protein concentration found in supernatants from cultures grown in SCGR broth. Based on these results, we used a similar purification protocol in the present work except that *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) were grown in the complex medium BMMY, which allowed the successful purification of the highly-related EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d). In this respect, the ammonium sulfate precipitation yielded a 65–68% of the bacteriocin found in culture supernatants and, after the last reversed-phase FPLC step, a 21 and 7.2% of the initial EntL50A and EntL50B amount was obtained, respectively. An increase in bacteriocin activity was observed after ammonium sulfate precipitation of recombinant EntL50A and EntL50B, as well as after hydrophobic-interaction chromatography of EntL50B. These increases in biological activity, likely due to removal of bacteriocin activity inhibitors and/or activity enhancement by salts and/or hydrophobic solvents, have also been observed during the purification of the natural bacteriocin from *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995), recombinant EntL50A and EntL50B from *Sc. cerevisiae* (Basanta *et al.*, 2008b), and other bacteriocins such as PedPA-1 (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), EntA (Aymerich *et al.*, 1996), EntP (Cintas *et al.*, 1997), sakacin A (Tichaczek *et al.*, 1992), and sakacin P (Tichaczek *et al.*, 1992). On the contrary, EntL50B showed a reversible reduced bacteriocin activity in the fraction eluted from the cation-exchanger matrix, which was more pronounced during purification of EntL50A and EntL50B from recombinant cultures of *Sc. cerevisiae* (Basanta *et al.*, 2008b). This phenomenon is likely due to the interference of the highly concentrated salts in the elution buffer (1 M NaCl) with the electrostatic interaction of the bacteriocin peptides with the target cell surface. Due to its less hydrophobicity, EntL50B showed a reduced adsorption to the hydrophobic-interaction and reversed-phase matrixes, and thus these chromatographic steps were rate-limiting for purification of larger quantities of recombinant EntL50B from *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02). It is worth noting that the yield of EntL50A and EntL50B purified from *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively, was approximately 2- and 6-fold lower, respectively, than that of the recombinant peptides purified from *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) and *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectively, while the specific antimicrobial activity of EntL50A and EntL50B purified from *Pc. pastoris* strains was 60-fold and 6-fold higher, respectively, than that of the recombinant peptides purified from *Sc. cerevisiae* strains.

The MALDI-TOF MS analysis of fraction containing recombinant EntL50B showed a major peptide with exactly the same molecular mass as natural EntL50B (5,178 Da) (Cintas *et al.*, 1998a), demonstrating that the recombinant peptide has been correctly processed by the Kex2 enzyme, and a second major peptide with molecular mass of 5,194 Da. This discrepancy may be ascribed to the spontaneous modification of one of the methionine residues found in the bacteriocin molecule (Met1 or Met24) (Cintas *et al.*, 1998a). Thus, by assuming that Met1 or Met24 have become oxidized to methionine sulfoxide (MetSO), it would produce an addition of 16 Da to the theoretical mass, and a molecular mass of 5,194 Da would be obtained. In this respect, it is widely known that Met is the amino acid most sensitive to reactive oxygen, resulting in a wide range of peptides and proteins with a reduced biological activity (Brot and Weissbach, 1991; Weissbach *et al.*, 2002). Similarly, it has been

often reported that Met residues in bacteriocins become spontaneously oxidized, specially during their purification to homogeneity, leading to loss or reduction of their antimicrobial activity (Casaus *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999a; Cintas *et al.*, 2000d; Johnsen *et al.*, 2000). On the other hand, MALDI-TOF MS analysis of fraction containing recombinant EntL50A revealed a minor peptide with a molecular mass similar to that of natural EntL50A (5,190 Da) (Cintas *et al.*, 1998a), demonstrating that the recombinant peptide has been correctly processed by the Kex2 enzyme, and five major peptides with molecular masses of 6.2–6.9 kDa. At first glance, it is possible to speculate that most EntL50A molecules are not correctly processed by the Kex2 enzyme, as a result of a reduced recognition of the the Kex2 signal cleavage site (Glu-Lys-Arg) due to a conformational interference exerted by the N-terminus of the peptide molecule; however, the high similarity between EntL50A and EntL50B (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d) allowed us to preclude this possibility. Regarding this, we favor the possibility that recombinant EntL50A is associated to an hitherto unknown compound, similarly as previously suggested for PedPA-1 heterologously produced by *Pc. pastoris* (Beaulieu *et al.*, 2005) and EntL50A purified from recombinant *Sc. cerevisiae* strains (Basanta *et al.*, 2008b). Apart from this modification, and considering again the high similarity between both peptides, it is likely that one or both Met residues in EntL50A have also become oxidized to MetSO or MetO₂, respectively. Interestingly, the specific antimicrobial activity of recombinant EntL50A and EntL50B purified from *Sc. cerevisiae* strains was drastically diminished during the purification process to a 2.6 and 5.5% of that showed by the culture supernatants, respectively, which was likely due to the oxidation of both Met residues with a concomitant reduction in their bacteriocin activity (Basanta *et al.*, 2008b). On the contrary, the antimicrobial specific activity of recombinant EntL50A and EntL50B purified from *Pc. pastoris* was a 205 and 75% of that in the culture supernatants, respectively, suggesting that the oxidation of only one Met residue is not deleterious for the bacteriocin activity. Moreover, and based on these observations, we favor the possibility that only Met1 in EntL50A and EntL50B purified from *Pc. pastoris* has been oxidized since Met24 is found at the somewhat less conserved amphiphilic C-terminal of the bacteriocin peptides which is thought to penetrate into the hydrophobic part of the target cell membrane, thereby mediating membrane leaking and subsequent cellular death (Fimland *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Miller *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2000; Fimland *et al.*, 2002; Kazazic *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005a).

EntL50A and EntL50B heterologously produced by *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) and *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectively, were further characterized by protein electrophoresis, Western blotting and an overlay assay, which showed their strong tendency to form aggregates, likely due to hydrophobic interactions. It is worthy to note that recombinant EntL50A and EntL50B from *Pc. pastoris*, similarly as these bacteriocin peptides heterologously produced by *Sc. cerevisiae* strains (Basanta *et al.*, 2008b), migrated with an apparent molecular mass of about 7,000 Da, while EntL50 (EntL50A and EntL50B) from the wild-type strain migrated as a 3,600 Da protein (Cintas *et al.*, 1995). These differences may be explained by the following factors: (i) the bands visualized in the gels are indeed dimers of recombinant EntL50A or EntL50B, and/or (ii) these peptides migrate differently if electrophoresed independently or together, as a result of changes in the molecule conformation due to

peptide-peptide interactions. Moreover, recombinant peptides and peptide aggregates were specifically detected using antibodies specific to EntL50A and EntL50B, respectively, however, only non-aggregated molecules were shown to be biologically active. Contrarily to this, bacteriocin peptide aggregates purified from *Sc. cerevisiae* cultures were also shown to be biologically active (Basanta *et al.*, 2008b), which may reflect a higher protein concentration.

To our best knowledge, the results described hereby clearly demonstrate for the first time the heterologous expression and secretion of a non pediocin-like bacteriocin, EntL50 (EntL50A and EntL50B), by the methylotrophic yeast *Pc. pastoris*. The cloning of *entL50A* and *entL50B* fused to *MF α 1_s* was enough for the efficient production of biologically active EntL50A and EntL50B by *Pc. pastoris*, which was indeed shown to be more suitable than *Sc. cerevisiae* for the heterologous production of these antimicrobial peptides. The developed bacteriocinogenic *Pc. pastoris* strains may facilitate future applications of EntL50 (EntL50A and EntL50B) in the pharmaceutical, food and beverage industries, similarly as many pharmaceuticals and enzymes derived from methylotrophic yeasts which either have entered the market or are expected to do so in the near future (Hollenberg and Gellissen, 1997; Gellissen, 2000). Likewise, the independent production and purification of recombinant EntL50A and EntL50B may permit unraveling the mechanisms involved in their mode of action, since the potential application of bacteriocinogenic microorganisms and/or their bacteriocins requires an in-depth knowledge of how they exert their bactericidal effect. Despite our promising results, further research effort should be addressed to optimization of bacteriocin production and purification by one or more of the following strategies: (i) optimization of gene dosage (Sreekrishna *et al.*, 1997); (ii) incorporation of a positively charged amino acid residue at the N-terminus of the signal peptide (Tsuchiya *et al.*, 2003); (iii) use of protease-deficient host strains (Sreekrishna *et al.*, 1997); (iv) use of uracil instead of zeocin as selective agent to avoid mutagenic activity (Sreekrishna *et al.*, 1997; Cereghino and Cregg, 2000); (v) use of unbuffered media to inactivate neutral proteases, as well as to improve the proteolytic stability and to reduce the producer cell adsorption of secreted proteins (Sreekrishna *et al.*, 1997; Trucksis *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2006); (vi) enhancement of the cellular mass by using carbon sources that support growth and do not repress methanol induction (Sreekrishna *et al.*, 1997); (vii) growth at different temperatures and in fermentors (Cereghino *et al.*, 2002); (viii) use of appropriate flask designs (Villate *et al.*, 2001); and, for certain food applications, (ix) use of stronger promoters not inducible by methanol, such as GAP, FLD1, PEX8 and YPT1 (Cereghino and Cregg, 1999, 2000; Ilgen *et al.*, 2005).

V.6. REFERENCES

- Aymerich, T., H. Holo, L. S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga and I. F. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676–1682.
- Basanta, A., J. Sánchez, B. Gómez-Sala, C. Herranz, P. E. Hernández and L. M. Cintas. 2008a. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *Int. J. Food. Microbiol.* (manuscript accepted for publication, Ref. No FOOD-D-07-00582).
- Basanta, A., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, P. E. Hernández and L. M. Cintas. 2008b. Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting enterocin L50 (L50A and L50B) from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* (submitted for publication).
- Beaulieu, L., D. Groleau, C. B. Miguez, J. F. Jetté, H. Aomari and M. Subirade. 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.* 43: 111–125.
- Benz, R., G. Jung and H. -G. Sahl. 1991. Mechanism of channel forming lantibiotics in black lipid membranes. In: “Nisin and novel lantibiotics”, pp. 359–372. Jung, G. and H. -G. Sahl (eds.). ESCOM, Scientific Publishers BV, The Netherlands.
- Bhunja, A. K., M. G. Johnson and B. Ray. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* 2: 319–322.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela and P. J. Barr. 1984. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642–4646.
- Brake, A. J. 1990. α -Factor leader-directed secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol.* 185: 408–421.
- Breukink, E., I. Weidemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. -G. Sahl and B. de Kruijff. 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286: 2361–2364.
- Brey, S. E., S. de Costa, P. J. Rogers, J. H. Bryce, P. C. Morris, W. J. Mitchell and G. G. Stewart. 2003. The effect of proteinase A on foam-active polypeptides during high and low gravity fermentation. *J. Inst. Brew.* 109: 194–202.
- Brot, N. and H. Weissbach. 1991. Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biofactors* 3: 91–96.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes and P. E. Hernández. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.
- Cereghino, G. P. L. and J. M. Cregg. 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 422–427.
- Cereghino, G. P. L., A. J. Sunga, J. L. Cereghino and J. M. Cregg. 2001. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. In: “Genetic engineering: principles and methods, vol. 23”, pp. 157–169. Setlow, J. K. (ed.). Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, EE.UU.
- Cereghino, G. P. L., J. L. Cereghino, C. Ilgen and J. M. Cregg. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329–332.
- Cereghino, J. L. and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 45–66.
- Chen, Y., R. D. Ludescher and T. J. Montville. 1997b. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4770–4777.

- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández and H. Holo. 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havårstein, P. E. Hernández and I. F. Nes. 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes and L. S. Håvarstein. 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández and P. E. Hernández. 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández and I. F. Nes. 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes and P. E. Hernández. 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Technol. Int.* 7: 281–305.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Cotter, P. D., C. Hill and R. P. Ross. 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777–788.
- Cregg, J. M., T. S. Vedvick and W. C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11: 905–910.
- Cregg, J. M., J. L. Cereghino, J. Shi and D. R. Higgins. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16: 23–52.
- Criado, R. 2006. Caracterización inmunoquímica y genética de la producción de las enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Criado, R., D. B. Diep, Å. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández and L. M. Cintas. 2006a. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6653–6666.
- Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P. E. Hernández and L. M. Cintas. 2006b. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7634–7643.
- Daeschel, M. A. 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 63–91. Hoover, D. G. and L. R. Steenson (eds.). Academic Press, Inc., New York, EE.UU.
- De Vuyst, L. and F. Leroy. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill and P. Ross. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans and J. Hugenholtz. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193–202.

- Diep, D. B. and I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo and I. F. Nes.** 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2384–2389.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen and H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Eaton, T. J. and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
- Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo and I. F. Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria, an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639–654.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85–106.
- Fernández, M., M. Martínez-Bueno, M. C. Martín, E. Valdivia and M. Maqueda.** 2007. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1350–1361.
- Fimland, G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes and J. Nissen-Meyer.** 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3313–3318.
- Fimland, G., L. Johnsen, L. Axelsson, M. B. Brurberg, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink and J. Nissen-Meyer.** 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182: 2643–2648.
- Fimland, G., V. G. H. Eijsink and J. Nissen-Meyer.** 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* 148: 3661–3670.
- Foulquié-Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou and L. de Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.
- Franz, C. M. A. P., W. H. Holzapfel and M. E. Stiles.** 1999a. Enterococci at the crossroads of food safety?. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1–24.
- Franz, C. M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings and W. H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385–4389.
- Franz, C. M. A. P., M. E. Stiles, K. H. Schleifer and W. H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105–122.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel and A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Gajic, O., G. Buist, M. Kojic, L. Topisirovic, O. P. Kuipers and J. Kok.** 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34291–34298.
- Gálvez, A., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno and E. Valdivia.** 1989. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* 140: 57–68.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López and N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.
- Garneau, S., N. I. Martin and J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.
- Gellissen, G.** 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 741–750.

- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall and D. B. Clewell. 1994. Genetic structure of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335–7344.
- Giraffa, G. 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in the dairy technology. *Food Microbiol.* 12: 291–299.
- Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215–222.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M. Cintas and P. E. Hernández. 2004. Performance and applications of polyclonal antipeptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2247–2255.
- Gutiérrez, J., R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernández. 2005a. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3004–3008.
- Gutiérrez, J., D. Bourque, R. Criado, Y. J. Choi, L. M. Cintas, P. E. Hernández and C. B. Míguez. 2005b. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 125–131.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas and P. E. Hernández. 2005c. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 239–250.
- Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok and P. E. Hernández. 2006. High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 41–51.
- Han, X., L. B. Ye, B. Z. Li, G. Bo, W. J. Cai, Z. Hong, Y. L. She, Y. Li, L. B. Kong and Z. H. Wu. 2006. Expression, purification and characterization of the hepatitis B virus entire envelope large protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49: 168–175.
- Herranz, C. and A. J. M. Driessen. 2005. *Sec*-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1959–1963.
- Hollenberg, C. P. and G. Gellissen. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 554–560.
- Holo, H., Ø. Nilssen and I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Holzappel, W. H., R. Geisen and U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343–362.
- Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez and H. M. Dodd. 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 818–823.
- Hummel, A. S., W. H. Holzappel and C. M. A. P. Franz. 2007a. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 1–7.
- Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzappel and C. M. A. P. Franz. 2007b. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 730–739.
- Ilgen, C., J. L. Cereghino and J. M. Cregg. 2005. *Pichia pastoris*. In: “Production of recombinant proteins: novel microbial and eucaryotic expression systems”, pp. 143–162. Gellissen, G. (ed.). Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Jack, R. W., J. R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171–200.
- Johnsen, L., G. Fimland, V. Eijsink and J. Nissen-Meyer. 2000. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4798–4802.

- Johnsen, L., G. Fimland and J. Nissen-Meyer.** 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243–9250.
- Kazacic, M., J. Nissen-Meyer and G. Fimland.** 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* 148: 2019–2027.
- Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337–349.
- Leroy, F., J. Verluyten, W. Messens and L. de Vuyst.** 2002. Modelling contributes to the understanding of the different behaviour of bacteriocin-producing strains in a meat environment. *Int. Dairy J.* 12: 247–253.
- Leroy, F. and L. de Vuyst.** 2005. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *Int. J. Food Microbiol.* 100: 141–152.
- Makrides, S. C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60: 512–538.
- Martín, M.** 2006. Identificación y evaluación de la expresión de genes que codifican bacteriocinas y detección de factores potenciales de virulencia de enterococos aislados de palomas torcaces (*Columba palumbus*). Caracterización bioquímica y genética de la columbicina A de *Enterococcus columbae* PLCH2 y construcción de quimeras génicas que permiten la producción y expresión funcional de la enterocina A y la pediocina PA-1 y su coproducción con la nisina A en cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*. Ph.D. thesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernández.** 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69: 520–531.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernández.** 2007b. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 667–675.
- Martínez, J. M., J. Kok, J. W. Sanders and P. E. Hernández.** 2000b. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3543–3549.
- Miller, K. W., R. Schamber, O. Osmanagaoglu and B. Ray.** 1998. Isolation and characterization of pediocin AcH chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1997–2005.
- Moll, G. N., W. N. Konings and A. J. M. Driessen.** 1999b. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185–198.
- Muller, S., T. Sandal, P. Kamp-Hansen and H. Dalbøge.** 1998. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Y. lipolytica*. *Yeast* 14: 1267–1283.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Håvarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F. and V. G. H. Eijsink.** 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. In: “Cell-Cell Signaling in Bacteria”, pp. 175–192. Dunphy, G. M. and S. C. Winans (eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C., EE.UU.
- Nes, I. F. and H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 55: 50–61.
- Nes, I. F., D. B. Diep and H. Holo.** 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.

- Nieto-Lozano, J. C., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, C. Peláz and I. F. Nes.** 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1985–1990.
- Nilsen, T., I. F. Nes and H. Holo.** 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2975–2984.
- O’Keeffe, T., C. Hill and R. P. Ross.** 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1506–1515.
- O’Sullivan, L., R. P. Ross and C. Hill.** 2002a. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- Ogier, J. -C. and P. Serror.** 2008. Part VI: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* (in press).
- Ramnath, M., S. Arous, A. Gravesen, J. W. Hastings and Y. Héchar.** 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 150: 2663–2668.
- Ray, B.** 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as biopreservatives: an overview. In: “*Food biopreservatives of microbial origin*”, pp. 177–205. Ray, B. and M. A. Daeschel (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, EE.UU.
- Ringø, E., U. Schillinger and W. Holzapfel.** 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: “*Microbial Ecology of the Growing Animal, 2*”, pp. 408–443. Holzapfel, W. and P. Naughton (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, United Kingdom.
- Ross, R. P., S. Morgan and C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernández.** 2007b. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food. Microbiol.* 117: 295–305.
- Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas and P. E. Hernández.** 2008. Cloning and Production of Hiracin JM79, a Sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in Heterologous Lactic Acid Bacteria (LAB) and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2471–2479.
- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia and M. Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1633–1641.
- Schägger, H. and G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368–379.
- Schiffer, M., C. -H. Chang and F. G. Stevens.** 1992. The function of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng.* 5: 213–214.
- Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks and I. S. Petrorius.** 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647–656.
- Schuster, M., A. Einhauer, E. Wasserbauer, F. Süßenbacher, C. Ortner, M. Paumann, G. Werner and A. Jungbauer.** 2000. Protein expression in yeast; comparison of two expression strategies regarding protein maturation. *J. Biotechnol.* 84: 237–248.
- Sebban-Kreuzer, C., P. Deprez-Beauclair, A. Berton and I. Crenon.** 2006. High-level expression of nonglycosylated human pancreatic lipase-related protein 2 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49: 284–291.
- Skaugen, M., L. M. Cintas and I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. In: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. and P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, EE.UU.

- Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam and L. A. Birkenberger. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55–62.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Tannock, G. W. and G. Cook. 2002. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: “*The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, antibiotic resistance, and infection control*”, pp. 101–132. Gilmore, M. S., D. B. Clewell, P. M. Courvalin, G. M. Dunne, B. E. Murray and L. B. Rice (eds.). ASM Press, Washington D.C., EE.UU.
- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel and W. P. Hammes. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460–468.
- Trucksis, M., T. L. Conn, A. Fasano and J. B. Kaper. 1997. Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*. *Infect. Immun.* 65: 4984–4988.
- Tsuchiya, Y., K. Morioka, J. Shirai, Y. Yokomizo and K. Yoshida. 2003. Gene design of signal sequence for effective secretion of protein. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 3: 261–262.
- Van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl and L. M. T. Dicks. 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 29–40.
- Vaughan, A., T. O’Sullivan and D. van Sinderen. 2005. Enhancing the microbiological stability of malt and beer – a review. *J. Inst. Brew.* 111: 355–371.
- Villate, F., A. S. Hussein, T. T. Bachmann and R. D. Schmid. 2001. Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 463–465.
- Von Mollendorff, J. W., S. D. Todorov and L. M. T. Dicks. 2007. Factors affecting the adsorption of bacteriocins to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142: 209–220.
- Weissbach, H., F. Etienne, T. Hoshi, S. H. Heinemann, W. T. Lowther, B. Matthews, G. St John, C. Nathan and N. Brot. 2002. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 172–178.
- Yang, R., M. C. Johnson and B. Ray. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355–3359.
- Zhang, H., S. Yoshida, T. Aizawa, R. Murakami, M. Suzuki, N. Koganezawa, A. Matsuura, M. Miyazawa, K. Kawano, K. Nitta and Y. Kato. 2000. In vitro antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2701–2705.

CAPÍTULO VI/CHAPTER VI

Discusión General

En este trabajo de investigación se ha procedido al desarrollo y la evaluación de un método de bioconservación de la cerveza basado en la utilización de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas de origen alimentario como un componente más de un sistema de protección de la calidad en el que se incluyen además diversas “barreras” u “obstáculos” al desarrollo de las bacterias lácticas alterantes de este producto. A este respecto, puede hipotetizarse que la utilización de: (i) bacteriocinas y/o sus mezclas, parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad, (ii) medios fermentados por bacterias lácticas bacteriocinogénicas o por cepas recombinantes bacteriocinogénicas de *Saccharomyces cerevisiae* y/o (iii) estas levaduras con la capacidad de producir bacteriocinas biológicamente activas en la cerveza, contribuiría a impedir la alteración microbiana de este producto por el desarrollo de bacterias lácticas. Conviene destacar que la estrategia de bioconservación de la cerveza propuesta en este trabajo no sólo contribuiría a garantizar su calidad higiénico-sanitaria, sino que también satisfaría las demandas de los consumidores que, cada vez más, requieren alimentos más seguros y menos procesados y muestran un mayor rechazo al empleo de aditivos químicos en la industria alimentaria. Por todo ello, se propone el empleo de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen cárnico *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* BB24 (productora de nisina A [NisA]), *Pediococcus acidilactici* 347 (productora de pediocina PA-1 [PedPA-1]), *Enterococcus faecium* L50 (productora de enterocinas L50 [L50A y L50B], P [EntP] y Q [EntQ]), *E. faecium* P13 (productora de EntP), *E. faecium* T136 (productora de enterocinas A [EntA] y B [EntB]) y *Lactobacillus sakei* 148 (productora de lactocina S [Las]), así como el desarrollo de diversas técnicas bioquímicas, inmunoquímicas y genéticas, para desarrollar los siguientes objetivos:

1. Evaluación de estas bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario como bioconservantes de la cerveza.
2. Expresión y secreción heteróloga de la enterocina L50 (EntL50 [EntL50A y/o EntL50B]) en *Sc. cerevisiae*.
3. Expresión y secreción heteróloga de EntL50 (EntL50A y/o EntL50B) en *Pichia pastoris*.

VI.1. EVALUACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN ALIMENTARIO COMO BIOCONSERVANTES DE LA CERVEZA

VI.1.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS LÁCTICAS BACTERIOCINOGÉNICAS DE ORIGEN ALIMENTARIO Y DE SUS BACTERIOCINAS FRENTE A BACTERIAS LÁCTICAS ALTERANTES DE LA CERVEZA

Las bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario evaluadas mostraron espectros de acción antimicrobiana variables, tanto en lo que respecta a los microorganismos indicadores sensibles como a la magnitud (3,0–33,5 mm) y el tipo de halos de inhibición (nítidos o difusos) mediante el empleo de la técnica de inhibición por siembra en picadura (TISP) (Tabla VI.1). De las cepas analizadas, *Lc. lactis* BB24 mostró una potente actividad antimicrobiana frente a la totalidad de los microorganismos utilizados como indicadores. Por otra parte, *E. faecium* L50, *P. acidilactici* 347 y *Lb.*

sakei 148 inhibieron el desarrollo de la mayoría de las bacterias lácticas alterantes de cerveza; no obstante, ninguna de estas cepas bacteriocinogénicas ejerció actividad antimicrobiana frente a las tres cepas de *Lactobacillus lindneri* analizadas, *Lactobacillus brevis* NFBC104 y *Pediococcus damnosus* CECT4680. Sin embargo, *E. faecium* P13 y *E. faecium* T136 mostraron un espectro antimicrobiano reducido y similar, así pues, únicamente inhibieron el desarrollo de seis bacterias lácticas alterantes de la cerveza.

Considerando estos resultados se procedió a determinar la actividad antimicrobiana de los correspondientes sobrenadantes libres de células de los cultivos (en adelante sobrenadantes) mediante la técnica de difusión en agar (TDA) y un ensayo en placas microtituladoras (EPM) (sección III.4.1) (Holo *et al.*, 1991; Cintas *et al.*, 2000d). Los resultados de ambos ensayos fueron similares entre sí (Tabla III.2) y, de forma general, coincidieron con los obtenidos mediante TISP (Tabla VI.1), lo que sugiere que la inhibición ejercida por estos microorganismos no se debe a la competencia por los sustratos del medio de cultivo, ni a un descenso de pH producido como consecuencia de su metabolismo fermentativo, ni a la presencia de bacteriófagos, sino a la producción y liberación extracelular de sustancias antimicrobianas termoestables (*i.e.*, bacteriocinas). A este respecto, los sobrenadantes de *Lc. lactis* BB24 (productora de NisA) mostraron el espectro antimicrobiano más amplio y potente, así pues, inhibieron el desarrollo de todas las bacterias lácticas alterantes de la cerveza, lo que coincide con los resultados obtenidos en trabajos previos (Ogden y Tubb, 1985; Ogden, 1986; Ogden *et al.*, 1988; Daeschel *et al.*, 1991; Delves-Broughton *et al.*, 1996). Asimismo, los sobrenadantes de *E. faecium* L50 (productora de EntL50 [EntL50A y EntL50B], EntP y EntQ), *Lb. sakei* 148 (productora Las) y *P. acidilactici* 347 (productora de PedPA-1) mostraron un espectro de acción amplio y potente, inhibiendo el desarrollo del 76, el 71 y el 62% de las bacterias lácticas alterantes de cerveza, respectivamente. Por otra parte, los sobrenadantes de *E. faecium* P13 (productora de EntP) y *E. faecium* T136 (productora de EntA y EntB) mostraron un espectro de acción reducido inhibiendo sólo a seis y siete de las bacterias lácticas alterantes de la cerveza, lo que representa un 18 y un 21%, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos en trabajos previos, ya que estas enterocinas son muy activas frente a microorganismos patógenos de los alimentos (por ej.: *Listeria monocytogenes*); sin embargo, su espectro de acción frente a otras bacterias lácticas es reducido (Casaus *et al.*, 1997; Cintas *et al.*, 1997). Por otra parte, en un estudio reciente Criado *et al.* (2006b) demostraron que la producción de EntL50 (EntL50A y EntL50B) está influida por la temperatura de incubación. Así pues, EntL50A y EntL50B se producen en el rango de temperaturas de 16–42°C, detectándose su máxima producción en los cultivos desarrollados a 25°C. A este respecto, considerando que la actividad antimicrobiana de *E. faecium* L50 frente a bacterias lácticas alterantes de la cerveza se debe principalmente a la producción de estas bacteriocinas, si los correspondientes sobrenadantes de *E. faecium* L50 se hubieran obtenido a 25°C, la producción de EntL50A y EntL50B habría sido mayor y, probablemente, su espectro de acción antimicrobiana habría resultado aún más potente.

Tabla VI.1. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario frente a bacterias lácticas alterantes de la cerveza

Microorganismos indicadores	Cepa	Microorganismos bacteriocinogénicos					
		<i>Enterococcus faecium</i>			<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
		L50	T136	P13	347	BB24	148
		TISP ^a	TISP	TISP	TISP	TISP	TISP
<i>Lactobacillus brevis</i>	216	13,0 n2	ZIND	ZIND	ZIND	18,1 n2	13,1 D
	BB120	12,6 D	ZIND	ZIND	ZIND	16,4 D	11,0 D
	2150	7,8 n2	ZIND	ZIND	11,4 n2	15,9 D	6,2 D
	104	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	3,8 n	ZIND
	108	11,9 n	ZIND	ZIND	ZIND	20,1 n	9,5 n-
	111	3,4 n	ZIND	ZIND	10,5 n2	12,2 n	3,0 n-
	112	ZIND	ZIND	ZIND	12,4 n2	11,6 n2	ZIND
<i>Lactobacillus buchnerii</i>	4674	16,5 n	ZIND	ZIND	ZIND	33,5 n2	13,3 n2
<i>Lactobacillus collinoides</i>	110	3,4 n-	ZIND	ZIND	10,9 n2	12,4 n2	ZIND
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>delbrueckii</i>	286	17,4 n	ZIND	ZIND	ZIND	21,5 n	15,9 n2
<i>Lb. delbrueckii</i>	4684	12,0 n2	ZIND	ZIND	5,3 D	18,5 n2	10,6 n2
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subesp. <i>lactis</i>	4687	9,8 n2	ZIND	ZIND	ZIND	17,1 n2	11,7 n2
<i>Lactobacillus lindneri</i>	20690	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	10,3 n2	ZIND
	20691	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	9,2 n-	ZIND
	20692	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	22,2 n	ZIND
<i>Lactobacillus mali</i>	4149	20,0 n2	8,2 n2	5,1 n2	7,4 n	27,3 n2	18,2 n2
<i>Lactobacillus sakei</i>	906	11,4 n2	19,5 n	12,1 n	21,5 n	23,2 n2	12,6 n2
<i>Lactobacillus</i> spp.	4483	14,3 n	19,0 n	13,6 n	17,5 n	21,0 n	9,5 n
	101	7,4 n	ZIND	ZIND	11,9 n	20,9 n	6,4 n
<i>Pediococcus damnosus</i>	793	5,5 n	3,4 n	3,5 n-	8,9 n-	19,1 n2	4,8 n
	4679	6,4 n2	ZIND	ZIND	7,1 n2	12,0 n2	6,5 n2
	4680	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	30,8 n2	ZIND
	4692	ZIND	ZIND	ZIND	31,1 n	33,4 n	ZIND
	4693	19,3 n	ZIND	ZIND	20,0 n2	27,4 n2	18,5 n2
	4694	16,8 n2	10,9 n	10,1 n	19,0 n	20,5 n	10,7 n
	4775	8,7 n2	ZIND	ZIND	10,0 n2	14,0 n2	8,4 n2
	4790	5,7 n	ZIND	ZIND	11,0 n	15,0 n	6,3 n
	4797	18,0 n	ZIND	14,3 n	24,0 n2	25,1 n2	15,2 n2
	113	ZIND	ZIND	ZIND	10,0 n2	11,4 n2	ZIND
	114	ZIND	ZIND	ZIND	9,0 D	10,4 n2	ZIND
<i>Pediococcus inopinatus</i>	4777	12,7 n	11,6 n	ZIND	21,0 n	21,0 n2	12,8 n2
	4784	3,3 n	ZIND	ZIND	12,0 n2	12,7 n2	3,7 n-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4695	6,5 n	ZIND	ZIND	8,0 n2	11,2 n2	5,4 n2
<i>Pediococcus</i> spp.	2151	7,8 n2	ZIND	ZIND	10,0 n2	15,4 n2	6,8 n2

^aLa actividad antimicrobiana se evaluó mediante TISP y se expresó como el diámetro del halo de inhibición en mm. Los halos de inhibición se diferencian como: D= difuso, n= poco nítido, n= nítido y n2= muy nítido. ZIND, zona de inhibición no detectada.

Uno de los problemas de la utilización de las bacteriocinas como bioconservantes de los alimentos se deriva de la posible aparición y el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes (Rekhif *et al.*, 1994; Guinane *et al.*, 2006). A este respecto, numerosos estudios han demostrado que diversos microorganismos (por ej.: *Clostridium botulinum*, *Listeria* spp. y *Streptococcus* spp.) desarrollan poblaciones bacterianas resistentes si se cultivan en presencia de bacteriocinas como NisA, lacticina 3147 y divergicina V41 y otras bacteriocinas de la subclase IIa (principalmente PedPA-1) (Mazzotta y Montville, 1999; Duffes *et al.*, 2000; Mantovani y Russell, 2001; Gravesen *et al.*, 2002a, b; Vadyvaloo *et al.*, 2002; Cleveland-McEntire *et al.*, 2004; Garde *et al.*, 2004; Guinane *et al.*, 2006). La frecuencia de aparición de poblaciones de *Listeria* spp. resistentes a PedPA-1 es mayor (10^{-6} – 10^{-3}) que la obtenida al utilizar NisA (10^{-9} – 10^{-5}) y, en ambos casos, este fenómeno se debe a la exposición prolongada de estos microorganismos a concentraciones subletales de estas bacteriocinas (Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et*

al., 1997; Dykes y Hastings, 1998; Rasch y Knöchel, 1998; Bouttefroy y Millière, 2000; Gravesen *et al.*, 2002a). Asimismo, Gravesen *et al.* (2001) han demostrado que el desarrollo de poblaciones bacterianas de *L. monocytogenes* resistentes a PedPA-1 es un mecanismo del tipo “todo o nada”; sin embargo, la resistencia de los microorganismos de esta especie a NisA aumenta de forma gradual. Conviene destacar que los resultados obtenidos con la cepa *P. damnosus* CECT4797 (Fig. 3.1; Tabla III.3) son similares a los obtenidos por Gravesen *et al.* (2001). Así pues, se generó una población bacteriana de *P. damnosus* CECT4797 resistente a PedPA-1 mediante su desarrollo (cuatro ciclos de crecimiento) en presencia de dosis subletales de un sobrenadante de *P. acidilactici* 347 (540 UB/ml); sin embargo, el desarrollo (13 ciclos de crecimiento) de *P. damnosus* CECT4797 en presencia de dosis subletales de un sobrenadante de *Lc. lactis* BB24 (9.200 UB/ml) no permitió el desarrollo de una población bacteriana resistente a NisA; no obstante, se obtuvo un aumento de la resistencia de esta cepa a esta bacteriocina (2.750 veces comparado con la cepa salvaje). Sin embargo, el desarrollo (20 ciclos de crecimiento) de *P. damnosus* CECT4797 en presencia de dosis subletales de un sobrenadante de *E. faecium* L50 (275 UB/ml) generó una población bacteriana de *P. damnosus* CECT4797 con un aumento menor de su resistencia a las enterocinas de *E. faecium* L50 (300 veces comparado con la cepa salvaje). Esta dificultad para obtener resistencias podría deberse a que *E. faecium* L50 produce tres bacteriocinas (cuatro péptidos) pertenecientes a diferentes subclases: EntL50 (EntL50A y EntL50B) (subclases IIb y IIc), EntP (subclase IIa) y EntQ (subclase IIc), que muestran diferentes espectro de acción, actúan sinérgicamente (al menos EntL50A y EntL50B) (Cintas *et al.*, 1998a), y, probablemente, presentan diferentes mecanismos de acción. A este respecto, los resultados obtenidos sugieren que aunque EntQ no posee actividad antimicrobiana por sí misma, puede incrementar (efecto sinérgico) la actividad antimicrobiana de EntL50 y/o EntP (Tabla III.4), como se ha demostrado en combinaciones de otras bacteriocinas (Mazzotta y Montville, 1997; Limonet *et al.*, 2002). Además, EntL50A y EntL50B sintetizados *in vitro* mostraron actividad antimicrobiana independiente (aprox., 18.000–800.000 y 16.000–570.000 UB/ml, respectivamente) y su utilización combinada (ratio 1:1) permitió obtener una actividad 1,1–5,1 veces mayor que la correspondiente al efecto aditivo de los péptidos evaluados independientemente, lo que demuestra que estos péptidos actúan sinérgicamente frente a estos indicadores, a excepción del microorganismo indicador *Pediococcus inopinatus* (Fig. 3.2; Tabla III.5). Estos resultados son similares a los obtenidos por Cintas *et al.* (1998a) y este efecto sinérgico también se ha descrito para otras bacteriocinas de la subclase IIb (sistemas de dos péptidos) (Allison *et al.*, 1994; Cintas *et al.*, 1995; Jiménez-Díaz *et al.*, 1995; Anderssen *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 1999a) y bacteriocinas de diferentes clases producidas por cepas multibacteriocinogénicas (Hanlin *et al.*, 1993; Casaus *et al.*, 1997; Mulet-Powell *et al.*, 1998; Bouttefroy y Millière, 2000; Vignolo *et al.*, 2000; Limonet *et al.*, 2004a). Asimismo, se ha sugerido, y en algunos casos demostrado, que la producción de varias bacteriocinas por una misma cepa puede aumentar su actividad antimicrobiana y espectro de acción además de disminuir la probabilidad de desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes (Hanlin *et al.*, 1993; Deegan *et al.*, 2006). Por otra parte, conviene destacar que las poblaciones bacterianas de *P. damnosus* CECT4797 resistentes a PedPA-1, NisA y EntL50 conservaron esta resistencia durante varias generaciones cuando se desarrollaron en ausencia de estas

bacteriocinas. Estos resultados coinciden con los obtenidos para cepas de *L. monocytogenes* resistentes a NisA, PedPA-1 y otras bacteriocinas pertenecientes a la clase II (Rekhif *et al.*, 1994; Duffes *et al.*, 2000; Gravesen *et al.*, 2002a); sin embargo, otros autores han detectado una gran estabilidad en el fenotipo de la resistencia de PedPA-1 y una gran variabilidad en el fenotipo de la resistencia de NisA dependiendo de la cepa de *L. monocytogenes* (Dykes y Hastings, 1998; Gravesen *et al.*, 2002a) y, por ello, los resultados de este trabajo no pueden extrapolarse a todas las cepas de *P. damnosus*.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para elucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de resistencias a las bacteriocinas (sección II.3.4.8). A este respecto, Gravesen *et al.* (2002b) sugirieron la existencia de un mecanismo similar de resistencia a las bacteriocinas de la subclase IIa en *L. monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* y, probablemente, otras bacterias Gram-positivas. A este respecto, la aparición de mutantes resistentes en estos microorganismos podría deberse a la pérdida del sistema fosfotransferasa (PTS, del inglés *PhosphoTransferase System*) manosa-específico (EII_t^{Man}) y a la sobreexpresión del sistema PTS glucósido β -específico (EII^{Bgl}), siendo esto responsable también de que poblaciones bacterianas resistentes a una bacteriocina de la subclase IIa muestren resistencia cruzada frente a otras bacteriocinas de esta subclase (Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Dykes y Hastings, 1998; Ramnath *et al.*, 2000; Rasch y Knöchel, 1998; Gravesen *et al.*, 2002b). Por otra parte, la resistencia a NisA en *Lc. lactis* y, probablemente, otras bacterias Gram-positivas es un fenómeno multifactorial en el que están implicados simultáneamente numerosos mecanismos (por ej.: alteraciones de la pared celular y de la composición de fosfolípidos y ácidos grasos de la membrana) (Kramer, 2005; Kramer *et al.*, 2006; Guinane *et al.*, 2006). Asimismo, Gravesen *et al.* (2001) y Guinane *et al.* (2006) han demostrado la aparición de resistencia cruzada entre bacteriocinas pertenecientes a la clase I. Aunque numerosos estudios describieron la ausencia de resistencia cruzada entre las bacteriocinas pertenecientes a las clases I y II (Hanlin *et al.*, 1993; Rekhif *et al.*, 1994; Wan *et al.*, 1997; Rasch y Knöchel, 1998; Guinane *et al.*, 2006), se ha descrito el desarrollo de resistencia simultánea frente a NisA y PedPA-1 de una cepa de *L. monocytogenes*, y diversos autores han observado la aparición de resistencias cruzadas frente a bacteriocinas de las clases I y II (Gravesen *et al.*, 2002a, 2004; Naghmouchi *et al.*, 2007). De forma similar, en este trabajo se ha observado que: (i) las cepas resistentes a PedPA-1 mostraron resistencia cruzada a NisA y a las enterocinas de *E. faecium* L50, (ii) las cepas resistentes a NisA presentan resistencia cruzada a PedPA-1 y a las enterocinas de *E. faecium* L50 y (iii) las cepas resistentes a las enterocinas de *E. faecium* L50 mostraron resistencia cruzada a PedPA-1 y NisA. Por todo ello, independientemente del mecanismo(s) de resistencia por el que las bacterias lácticas alterantes de cerveza adquieren resistencia a estas bacteriocinas, sería conveniente proceder a su identificación y caracterización antes de proponer la utilización de estas bacteriocinas como bioconservantes de la cerveza.

VI.1.2. ASPECTOS DE SEGURIDAD DE *Enterococcus faecium* L50

Los enterococos se consideran microorganismos patógenos humanos oportunistas emergentes ya que causan el 12% de las infecciones nosocomiales y, por lo tanto, constituyen el segundo género de mayor importancia en las infecciones hospitalarias (secciones II.4.2.1 y II.4.2.2) (Klare *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2003; Klein, 2003; Kayser, 2003). Asimismo, los enterococos poseen un amplio espectro de resistencias naturales (intrínsecas) y adquiridas (transferibles) a antibióticos, además de su resistencia a diversos factores físico-químicos (por ej.: bajo pH y altas temperaturas y concentraciones de sal) y condiciones ambientales adversas (Eaton y Gasson, 2001; Klare *et al.*, 2001, 2003; Ogier y Serror, 2008). En este contexto, la supervivencia de los enterococos en el ambiente hospitalario está relacionada con: (i) su resistencia natural a diversos detergentes utilizados en la desinfección y diversos antibióticos de uso común en terapia humana y (ii) su capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos. Además, el incremento en el empleo de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de diversas infecciones provoca la selección de enterococos resistentes a antibióticos (ARE, del inglés *Antibiotic-Resistant Enterococci*), en algunos casos multirresistentes, y, por lo tanto, provoca un aumento de la incidencia de los enterococos en infecciones nosocomiales (Klare *et al.*, 2003). Por todo ello, en la actualidad existe una gran controversia sobre la utilización de los enterococos en la industria alimentaria, principalmente de la especie *E. faecalis*, especialmente en lo que respecta a su posible resistencia a los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) (VRE, del inglés *Vancomycin Resistant Enterococci*) (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; de Vuyst *et al.*, 2003). En este contexto, se ha descrito que pueden aislarse con cierta facilidad de los alimentos enterococos resistentes a estos antibióticos (Pavia *et al.*, 2000; del Campo *et al.*, 2001; Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Giraffa, 2002; de Vuyst *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Pérez-Pulido *et al.*, 2006); no obstante, hasta el momento no se ha demostrado la transferencia de los mecanismos de resistencia a enterococos asociados a infecciones humanas (Pavia *et al.*, 2000) y estas cepas no presentan resistencia a antibióticos de importancia clínica relevante, entre los que se incluyen la ampicilina, gentamicina, penicilina y vancomicina (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006; Ogier y Serror, 2008). Además, conviene destacar que diversos autores han determinado que los enterococos de origen alimentario, principalmente de la especie *E. faecium*, muestran generalmente una sensibilidad a los antibióticos significativamente mayor que las cepas de origen clínico (Aguirre y Collins, 1993; Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; de Vuyst *et al.*, 2003; Mannu *et al.*, 2003; Ben Omar *et al.*, 2004; Busani *et al.*, 2004; Silva-Lopes *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2006; Hummel *et al.*, 2007a; Ogier y Serror, 2008). No obstante, a pesar de esta controversia creciente e incesante sobre la utilización de los enterococos en la industria alimentaria, conviene destacar que los alimentos que contienen enterococos de forma natural (sección II.4.3.1) se han consumido durante siglos sin riesgos aparentes para la salud humana (Giraffa, 1995; Giraffa *et al.*, 1997; Eaton y Gasson, 2001) y, además, algunas cepas de *E. faecium* están autorizadas como cultivos iniciadores, protectores, adjuntos y/o probióticos para la elaboración de diversos alimentos (principalmente productos lácteos) y como suplemento para la alimentación de ciertos tipos de animales (secciones II.4.3.1.4 y II.4.3.2).

En la Tabla VI.2 se muestra la susceptibilidad de *E. faecium* L50 a la acción antimicrobiana de diversos antibióticos, determinada mediante la técnica de disco sobre agar (Bauer *et al.*, 1966), actualizada y modificada por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002). De estos resultados, y considerando los criterios del NCCLS (2002) y Liofilchem (Teramo, Italia), en el caso del ácido fusídico, se deduce que *E. faecium* L50: (i) es sensible a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared celular; (ii) muestra sensibilidad o sensibilidad intermedia (eritromicina y kanamicina) a los antibióticos inhibidores de la síntesis proteica, a excepción de la clindamicina y estreptomicina, y (iii) es sensible a los antibióticos inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, a excepción del ácido nalidíxico (quinolona). Asimismo, estos resultados ponen de manifiesto que *E. faecium* L50 es sensible a los glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina), a la ampicilina y gentamicina, lo que reviste una gran importancia si se pretende evaluar la utilización de esta cepa en la industria alimentaria debido a que estos antibióticos se emplean en el tratamiento de infecciones clínicas causadas por enterococos resistentes a otros antibióticos (sección II.4.2.2.1). A este respecto, en un reciente y exhaustivo estudio realizado por de Vuyst *et al.* (2003) se detectó que de una colección de 63 cepas de *E. faecium* con actividad antimicrobiana aisladas de diversos sustratos (por ej.: alimentos, animales, piensos y muestras clínicas y no clínicas de humanos), únicamente siete (11%) mostraron resistencia a la vancomicina y teicoplanina, siendo destacable el hecho de que sólo una de ellas era de origen alimentario. Por otra parte, *E. faecium* L50 fue resistente a la clindamicina, la estreptomicina y el ácido nalidíxico, lo que no resulta sorprendente dada la amplia prevalencia de

Tabla VI.2. Susceptibilidad de *E. faecium* L50 a diversos antibióticos y criterios de sensibilidad/resistencia de *Enterococcus* spp.

Antibióticos	Mecanismo de acción	Concentración (µg/disco) ^a	Actividad antimicrobiana ^b (sensibilidad/resistencia) ^c	Criterios de interpretación del diámetro (mm) de los halos de inhibición		
				R	SI	S
Ampicilina	Inhibición de la síntesis de la pared celular	10	22,7 (S)	≤ 16	16–17	≥ 17
Penicilina G		10	17,2 (S)	≤ 14	14–15	≥ 15
Teicoplanina		30	19,0 (S)	≤ 10	11–13	≥ 14
Vancomicina		30	22,6 (S)	≤ 14	15–16	≥ 17
Ácido fusídico	Inhibición de la síntesis proteica	10	24,5 (S)	≤ 14	15–22	≥ 23
Clindamicina		2	11,7 (R)	≤ 14	15–20	≥ 21
Cloranfenicol		30	30,5 (S)	≤ 12	13–17	≥ 18
Eritromicina		15	16,7 (SI)	≤ 13	14–22	≥ 23
Estreptomicina		10	ZIND (R)	≤ 11	12–14	≥ 15
Gentamicina		10	17,3 (S)	≤ 12	13–14	≥ 15
Gentamicina		120	18,9 (S)	≤ 6	7–9	≥ 10
Kanamicina		30	16,4 (SI)	≤ 13	14–17	≥ 18
Nitrofurantoina		300	18,3 (S)	≤ 14	15–16	≥ 17
Tetraciclina		30	33,5 (S)	≤ 14	15–18	≥ 19
Ácido nalidíxico	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	30	ZIND (R)	≤ 13	14–18	≥ 19
Ciprofloxacina		5	24,0 (S)	≤ 15	16–20	≥ 21
Norfloxacina		10	19,2 (S)	≤ 12	13–16	≥ 17
Rifampicina		5	27,0 (S)	≤ 16	17–19	≥ 20

^aLa concentración de antibiótico se expresa en µg/disco, excepto en el caso de la penicilina en el que se expresa en unidades/disco.

^bLa actividad antimicrobiana de los antibióticos se cuantificó midiendo el diámetro en mm del halo de inhibición alrededor del disco.

^cLa sensibilidad/resistencia a cada antibiótico se determinó considerando el valor del diámetro del halo de inhibición y los criterios de sensibilidad/resistencia establecidos para *Enterococcus* spp. por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002), excepto en el caso del ácido fusídico, en el que se determinó según el criterio establecido por Liofilchem (Teramo, Italia). ZIND, zona de inhibición no detectada; R, resistencia; SI, sensibilidad intermedia; S, sensibilidad.

enterococos resistentes a estos antibióticos (Delgado *et al.*, 2002; Lautenbach *et al.*, 2003; Majhenič *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007b). Asimismo, *E. faecium* L50 mostró sensibilidad intermedia a la kanamicina, lo que es habitual ya que la resistencia a este aminoglucósido es intrínseca a los microorganismos del género *Enterococcus* (Franz *et al.*, 1999a).

Por otra parte, la seguridad de los enterococos también está muy cuestionada debido a la posible presencia de factores potenciales de virulencia, principalmente en *E. faecalis* y, en menor medida, *E. faecium*, entre los que se incluyen productos de secreción (por ej.: citolisina y gelatinasa) o factores de adhesión (por ej.: sustancia de agregación y proteína de superficie de los enterococos) (sección II.4.2.2.2) (Mundy *et al.*, 2000; Eaton y Gasson, 2001; Garza-Velasco *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2003; Kayser *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2004; Majhenič *et al.*, 2005; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos mostraron que *E. faecium* L50 sólo posee dos genes que codifican factores potenciales de virulencia: (i) *efaA_{fm}*, que codifica una adhesina característica de las cepas de *E. faecium* con propiedades similares a las proteínas asociadas con la adhesión en los microorganismos del género *Streptococcus* aunque su función en *E. faecium* es todavía desconocida (Eaton y Gasson, 2001) y (ii) *ccf*, que codifica una feromona sexual implicada en fenómenos de conjugación plasmídica con actividad quimiotáctica modulando la respuesta inmune y cuya presencia en cepas de *E. faecium* es habitual debido al intercambio de información genética entre *E. faecalis* y *E. faecium* inducido por feromonas (Eaton y Gasson, 2001). Asimismo, la ausencia de los genes *cylMBA* y *gelE* en *E. faecium* L50 confirman los resultados obtenidos mediante pruebas bioquímicas, que revelaron la carencia de actividad β -hemolítica y producción de gelatinasa en esta cepa. Por último, la baja incidencia de factores potenciales de virulencia en *E. faecium* L50 coincide con los resultados obtenidos previamente por otros autores para otras cepas de *E. faecium* de origen alimentario (Eaton y Gasson, 2001; Martín *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007b). De forma general, estos resultados y la susceptibilidad de *E. faecium* L50 a la mayoría de los antibióticos de relevancia clínica sugirieron de forma preliminar la posible seguridad de este microorganismo para su empleo en la industria alimentaria.

VI.1.3. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE *Enterococcus faecium* L50 PARA DESARROLLARSE Y PRODUCIR BACTERIOCINAS EN DIFERENTES SUSTRATOS CERVECEROS

Una de las estrategias para aplicar las bacteriocinas como bioconservantes de los alimentos se basa en el empleo como ingrediente alimentario de un sustrato previamente fermentado por una cepa bacteriocinogénica (sección II.3.4.10). A este respecto, la máxima producción de bacteriocinas se obtiene generalmente cuando las bacterias lácticas productoras se desarrollan en medios complejos (por ej.: MRS, TSB y BMMY) (Casaus, 1998; Gutiérrez, 2005; Citti, 2005); no obstante, su elevado coste económico impide su utilización para la obtención a gran escala de estos sustratos fermentados y sugiere el empleo para este fin de subproductos o productos de la industria alimentaria, al igual que se utilizan desde hace tiempo para la producción de antibióticos en la industria farmacéutica (Citti, 2005).

Conviene destacar que los resultados obtenidos (Fig. 3.3) demuestran que *E. faecium* L50 no se desarrolló ni produjo sus bacteriocinas biológicamente activas en mosto de cerveza (con y sin lúpulo), cervezas con diferente graduación alcohólica (1–5% de etanol, vol/vol) y “cerveza” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol); no obstante, en mosto de cerveza sin lúpulo sobrevivió durante seis días. La ausencia de desarrollo de *E. faecium* L50 en estos sustratos cerveceros podría deberse, al menos parcialmente, a los iso- α -ácidos del lúpulo (secciones II.1.3.3 y II.1.6) que ejercen un efecto bactericida o bacteriostático frente a las bacterias lácticas, ya que actúan como compuestos ionóforos que disipan el gradiente de pH transmembrana (Simpson, 1993a, b; Sakamoto *et al.*, 2001; Sakamoto, 2002; Iijima *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2006). La resistencia de las bacterias lácticas a los iso- α -ácidos del lúpulo se ha estudiado durante los últimos años y se ha descrito que se debe, principalmente, a la presencia de los genes *horA*, *horB* y/o *horC* (Sami *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2005a, b; Iijima *et al.*, 2007). Asimismo, en diversos estudios se ha demostrado que la producción de bacteriocinas está influida por diversos factores como la temperatura de fermentación, la composición del medio de cultivo (por ej.: carbohidratos, nitrógeno y fósforo), el pH inicial y final y el control del pH durante el desarrollo microbiano (Parente y Ricciardi, 1999; Messens *et al.*, 2003). A este respecto, la producción de bacteriocinas en *E. faecium* L50 es un proceso regulado térmicamente (sección II.4.4.1) (Cintas *et al.*, 2000d; Criado *et al.*, 2006b). El mosto sin lúpulo es un sustrato muy rico desde el punto de vista nutritivo (por ej.: almidón, sacarosa y compuestos nitrogenados); sin embargo, presenta pocas sustancias solubles en agua (por ej.: glucosa, maltosa, maltotriosa, aminoácidos y proteínas) y, por ello, no puede utilizarse para el desarrollo de bacterias y levaduras si no se realiza el proceso de maceración (sección II.1.4.2.2) (Sakamoto, 2002; Sakamoto *et al.*, 2003). Así pues, se puede deducir que, posiblemente, *E. faecium* L50 no puede desarrollarse en estos sustratos debido a que no puede utilizar las sustancias nutritivas presentes en el mosto sin lúpulo y/o la presencia de los iso- α -ácidos del lúpulo en los otros sustratos cerveceros. Por ello, en este estudio se procedió a la modificación de las condiciones experimentales mediante la adición de diferentes concentraciones de caldo MRS al mosto sin lúpulo para evaluar el desarrollo de *E. faecium* L50 y la producción de sus bacteriocinas biológicamente activas (Fig. 3.3; Tabla VI.3). Los resultados obtenidos demostraron que el enriquecimiento de mosto sin lúpulo con diferentes concentraciones de caldo MRS (12,5, 25 y 50%, vol/vol) permitió el desarrollo de *E. faecium* L50; no obstante, la producción de sus bacteriocinas sólo se detectó cuando el mosto sin lúpulo se suplementó con un 50% (vol/vol) de caldo MRS. El desarrollo de *E. faecium* L50 en este sustrato fue más lento que en caldo MRS; sin embargo, la actividad antimicrobiana de sus bacteriocinas, al menos EntL50, fue similar a la obtenida en caldo MRS. A este respecto, el caldo MRS es el medio de cultivo idóneo para el desarrollo y la producción de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 y otras bacterias lácticas bacteriocinogénicas de, entre otros, el género *Enterococcus* (Casaus, 1998; Cintas *et al.*, 2001; Herranz, 2001; Citti, 2005). Además, estos resultados sugieren que la cinética de descenso del pH durante la fermentación no influye en la producción de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 debido a que en los mostos enriquecidos con diferentes concentraciones de caldo MRS no se detectaron diferencias significativas en este parámetro.

Tabla VI.3. Crecimiento, acidificación y actividad antimicrobiana de *E. faecium* L50 desarrollado en diversos sustratos cerveceros y caldo MRS

Parámetros	Sustratos cerveceros y MRS/Tiempo de incubación (h)								
	Mosto sin lúpulo suplementado con un 12,5% de caldo MRS								
	0	6	12	24	36	48	72	96	144
ufc/ml ^a	8,4×10 ⁶	4,2×10 ⁶	2,2×10 ⁵	2,7×10 ³	1,7×10 ⁴	4,3×10 ⁶	1,0×10 ⁹	5,0×10 ⁸	3,4×10 ⁷
pH	5,3	5,2	5,0	5,0	4,8	4,6	4,4	4,4	4,4
mm ^b	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND
UB/ml ^c	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND
	Mosto sin lúpulo suplementado con un 25% de caldo MRS								
	0	6	12	24	36	48	72	96	144
ufc/ml	7,1×10 ⁶	3,2×10 ⁶	1,2×10 ⁵	9,6×10 ⁵	4,1×10 ⁷	1,0×10 ⁹	1,7×10 ⁸	1,3×10 ⁸	1,0×10 ⁸
pH	5,4	5,3	5,3	5,1	4,7	4,4	4,4	4,4	4,4
mm	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND
UB/ml	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND	IND
	Mosto sin lúpulo suplementado con un 50% de caldo MRS								
	0	6	12	24	36	48	72	96	144
ufc/ml	6,5×10 ⁶	9,2×10 ⁵	2,4×10 ⁶	2,3×10 ⁸	1,0×10 ⁹	1,3×10 ⁸	1,0×10 ⁸	9,5×10 ⁷	6,4×10 ⁷
pH	5,7	5,6	5,3	5,0	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4
mm	ZIND	ZIND	ZIND	8,1 n	8,8 n	8,0 D	ZIND	ZIND	ZIND
UB/ml	IND	IND	IND	60	60	35	IND	IND	IND
	MRS								
	0	6	12	24	36	48	72	96	144
ufc/ml	1,2×10 ⁷	1,2×10 ⁸	1,0×10 ⁹	1,2×10 ⁸	1,0×10 ⁸	1,3×10 ⁸	6,8×10 ⁷	4,4×10 ⁷	5,0×10 ⁷
pH	6,2	5,6	5,3	4,7	4,4	4,4	4,4	4,4	4,2
mm	ZIND	8,3 n	8,8 n	6,2 D	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND	ZIND
UB/ml	IND	40	50	35	IND	IND	IND	IND	IND

^aEl crecimiento microbiano se determinó mediante la técnica de recuento en placas de agar MRS (1,5%; m/vol) a 32°C durante 48 h, obteniéndose los recuentos de unidades formadoras de colonias (ufc/ml).

^bActividad antimicrobiana determinada mediante TDA empleando como microorganismo indicador *Lb. brevis* NFBC108 y expresada como el diámetro de inhibición en mm. Los halos de inhibición se diferencian como en la Tabla VI.1. ZIND, zona de inhibición no detectada empleando 50 µl de sobrenadante.

^cActividad antimicrobiana determinada mediante EPM empleando como microorganismo indicador *Lb. brevis* NFBC108 y expresada en UB/ml. IND, inhibición no detectada empleando 100 µl de sobrenadante.

Por otra parte, los resultados de este trabajo coinciden con los obtenidos por Vaughan *et al.* (2004), quienes describieron que la cepa *Lc. lactis* M30 no podía desarrollarse en mosto con lúpulo y cerveza (5% de etanol, vol/vol) y, por ello, no producía bacteriocinas biológicamente activas en estos sustratos cerveceros. No obstante, el enriquecimiento del mosto sin lúpulo con extracto de levadura y fosfato potásico permitió el desarrollo y la producción de las bacteriocinas de *Lc. lactis* M30 aunque sólo cuando el pH estaba ajustado a 6.5. Sin embargo, estos resultados y los obtenidos en este trabajo no coinciden con los descritos por Hartnett *et al.* (2002), quienes demostraron que de seis cepas aisladas de materias primas cerveceras (cebada y sorgo), *E. faecalis* T33, *E. faecium* A33, *Enterococcus mundtii* 4 y *Lc. lactis* S33 se desarrollaron y mostraron actividad antimicrobiana en mosto sin lúpulo; no obstante, las cepas *Lc. lactis* M30 y *Lc. lactis* M36 se desarrollaron en este sustrato pero no produjeron bacteriocinas. Por otra parte, Nauth (2002) ha patentado un compuesto que permite a la cerveza y a otras bebidas alcohólicas aumentar su estabilidad microbiológica. Este compuesto se obtiene: (i) adicionando al mosto un suplemento nutricional para aumentar la producción de NisA, (ii) ajustando el pH a 6.5, (iii) pasteurizando y enfriando el medio y (iv) fermentándolo con un cultivo productor de NisA. Considerando estos resultados, sería de gran interés proceder a la optimización de la producción de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 en mosto sin lúpulo con el objeto de evaluar la eficacia de este sustrato fermentado con actividad antimicrobiana como bioconservante de la cerveza. Por otra parte, conviene destacar que la incapacidad de *E. faecium* L50 de desarrollarse en mosto (con

y sin lúpulo), cervezas con diferente graduación alcohólica (1–5% de etanol, vol/vol) y “cervezas” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol) permite hipotetizar sobre su consideración como microorganismo no alterante de estos productos.

VI.1.4. EVALUACIÓN DEL MODO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS DE *Enterococcus faecium* L50 EN LA VIABILIDAD DE BACTERIAS LÁCTICAS ALTERANTES DE LA CERVEZA Y DE LA TASA DE APARICIÓN DE POBLACIONES BACTERIANAS RESISTENTES

Un aspecto de gran importancia al proponer el empleo de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 como bioconservantes de la cerveza es determinar si éstas ejercen un efecto bactericida o bacteriostático frente a las principales bacterias lácticas alterantes de este producto, así como elucidar si de su empleo se deriva la aparición y el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes lo que representa uno de los principales problemas del empleo de las bacteriocinas en la industria alimentaria (secciones II.3.4.8 y VI.1.1).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las bacteriocinas producidas por *E. faecium* L50 (principalmente EntL50A y EntL50B) ejercen a pequeñas dosis un efecto bactericida frente a *Lb. brevis* NFBC108 y *P. damnosus* CECT4797 (principales bacterias lácticas alterantes de la cerveza) (secciones II.1.7.1.1 y II.1.7.1.2) incluso cuando estos microorganismos se encuentran a dosis iniciales elevadas (2×10^3 y 5×10^5 ufc/ml) y se desarrollan bajo condiciones de crecimiento óptimas (por ej.: medio de cultivo MRS y crecimiento a 32°C) (Fig. 3.4). Así pues, estas bacteriocinas provocaron una rápida disminución de la población bacteriana inicial de 3 y 5 ciclos logarítmicos, respectivamente, lo que pone de manifiesto su modo de acción bactericida bajo las condiciones experimentales establecidas. Asimismo, la utilización de estas bacteriocinas a dosis bactericidas adecuadas impidió la aparición y el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes. Estos resultados también demuestran que *Lb. brevis* NFBC108 resultó más sensible a las bacteriocinas producidas por *E. faecium* L50 que *P. damnosus* CECT4797. A este respecto, la adición de 491 y 818 UB/ml de sobrenadante concentrado de *E. faecium* L50 a los cultivos de *Lb. brevis* NFBC108 (inóculo inicial de 2×10^3 y 5×10^5 ufc/ml, respectivamente) provocó una rápida eliminación de la población bacteriana inicial (efecto bactericida) y no se detectaron células viables a las 360 h de incubación de los cultivos (Figs. 3.4.A y 3.4.B). Sin embargo, en los cultivos de *P. damnosus* CECT4797 (inóculo inicial de 3×10^3 y 3×10^5 ufc/ml) fue necesario la adición de, al menos, 680 y 1.360 UB/ml para poder detectar un efecto bactericida de estas bacteriocinas y tampoco se detectaron células viables a las 360 h de incubación de los cultivos (Figs. 3.4.C y 3.4.D). Por otra parte, el hecho de que la adición de caldo MRS concentrado a los cultivos de *Lb. brevis* NFBC108 y *P. damnosus* CECT4797 no ejerciera ningún efecto frente a estos microorganismos permite hipotetizar que el efecto bactericida de los sobrenadantes de *E. faecium* L50 se debe a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por esta cepa. Por último, *Lb. lindneri* DSMZ20690 no resultó sensible a las bacteriocinas producidas por *E. faecium* L50 ni siquiera cuando se utilizaron concentraciones elevadas del correspondiente

sobrenadante concentrado (68.000 UB/ml). No obstante, se podría inhibir el desarrollo de este microorganismo mediante el empleo de estas bacteriocinas formando parte de un “sistema de obstáculos” (Leistner y Gorris, 1995; Leistner, 2000) en el que se incluyeran además otras bacteriocinas y barreras antimicrobianas (por ej.: iso- α -ácidos, etanol y ácidos orgánicos). A este respecto, las bacteriocinas de *E. faecium* L50 podrían emplearse junto con NisA, ya que esta bacteriocina mostró una gran actividad antimicrobiana frente a *Lb. lindneri* DSMZ20690 y otras bacterias lácticas alterantes de la cerveza (Tabla III.2).

Por otra parte, las bacteriocinas producidas por *E. faecium* L50 (principalmente EntL50A y EntL50B) mantienen su actividad biológica en diversos sustratos cerveceros, entre los que se incluyen mosto (con y sin lúpulo), cervezas con diferente graduación alcohólica (1–5% de etanol, vol/vol) y “cerveza” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol), como lo demuestra el hecho de que ejercieran a pequeñas dosis un efecto bactericida frente a *Lb. brevis* NFBC108 incluso cuando este microorganismo se encuentra a elevadas concentraciones ($4\text{--}5 \times 10^5$ ufc/ml) (Figs. 3.5 y 3.6). A este respecto, el efecto bactericida de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 fue diferente dependiendo del sustrato cervecero empleado, siendo este efecto más rápido en los diferentes tipos de cerveza que en el mosto cervecero. Conviene destacar que estos resultados demuestran que es factible inhibir el desarrollo de *Lb. brevis* NFBC108, uno de las principales especies alterantes de la cerveza, en mosto cervecero y cerveza mediante la adición de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 incluso cuando este microorganismo se encuentra a concentraciones de $4\text{--}5 \times 10^5$ ufc/ml, que son mucho mayores que las que podrían presentarse en estos sustratos en la industria cervecera. A este respecto, la adición de 1.636 UB/ml de sobrenadante concentrado de *E. faecium* L50 a los cultivos de *Lb. brevis* NFBC108 (inóculo inicial de $4\text{--}5 \times 10^5$ ufc/ml) desarrollados en mosto (con y sin lúpulo) provocó una rápida eliminación de la población bacteriana inicial (efecto bactericida) y no se detectaron células viables a las 144 h de incubación de los cultivos (Fig. 3.5). Por otra parte, en los cultivos de *Lb. brevis* NFBC108 (inóculo inicial de 4×10^5 ufc/ml) desarrollados en cerveza con diferente graduación alcohólica (1–5% de etanol, vol/vol) y “cerveza” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol) fue necesario la adición de, al menos, 3.272 UB/ml para poder detectar un efecto bactericida de estas bacteriocinas y tampoco se detectaron células viables a las 144 h de incubación de los cultivos (Fig. 3.6). En estos sustratos, el efecto bactericida fue mayor en cervezas con bajo contenido alcohólico (1% de etanol, vol/vol) (no se detectaron células viables a las 12 h de incubación), seguido de “cervezas” sin alcohol (0% de etanol, vol/vol) (no se detectaron células viables a las 24 h de incubación) y cervezas con alcohol (5% de etanol, vol/vol) (no se detectaron células viables a las 48 h de incubación) (Figs. 3.6.A, 3.6.B y 3.6.C). Estos resultados pueden explicarse por la existencia de un efecto sinérgico de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 y los compuestos antimicrobianos de la cerveza (por ej.: iso- α -ácidos del lúpulo, etanol y ácidos orgánicos) y/o por la diferente concentración de iso- α -ácidos presentes en la cerveza dependiendo de su grado alcohólico. Así pues, el efecto bactericida fue mayor en la cerveza con bajo contenido alcohólico (1% de etanol, vol/vol) ya que este tipo de cerveza tiene mayor cantidad de iso- α -ácidos del lúpulo que la cerveza con alcohol (5% de etanol, vol/vol) y, por otra parte, la “cerveza” sin alcohol (0% de etanol,

vol/vol) posee más iso- α -ácidos que los otros tipos de cerveza pero no posee etanol. A este respecto, en estudios recientes se ha demostrado un efecto sinérgico de NisA y otras bacteriocinas con etanol, metabisulfito, lactato de sodio, sorbato potásico y ácido cítrico (Brewer *et al.*, 2002; Bari *et al.*, 2005; Al-Holy *et al.*, 2006; Rojo-Bezares *et al.*, 2007a). El hecho de que la adición de sobrenadante concentrado de los diferentes sustratos cerveceros a los cultivos de *Lb. brevis* NFBC108 no ejerciera ningún efecto frente a este microorganismo permite hipotetizar que el efecto bactericida de los sobrenadantes de *E. faecium* L50 se debe a la acción antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por esta cepa y no a los compuestos antimicrobianos de estos sustratos cerveceros (por ej.: iso- α -ácidos del lúpulo, etanol y ácidos orgánicos). Por último, los resultados obtenidos demuestran que el efecto bactericida de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 en estos sustratos fue menor que el obtenido en el medio de cultivo MRS y podría deberse a que la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas puede estar influida por la composición química y las condiciones físicas de los sustratos alimentarios (Cleveland *et al.*, 2001; Aasen *et al.*, 2003). Así pues, la disminución de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de *E. faecium* L50 en los diferentes sustratos cerveceros podría deberse a: (i) su adhesión o adsorción a compuestos presentes en estos sustratos o a las células del microorganismo productor de las bacteriocinas debido al pH ácido de estos sustratos y/o (ii) su menor difusión en este sustrato. Los resultados de este trabajo resultan más satisfactorios que los descritos en un estudio similar realizado por Vaughan *et al.* (2004), en el que se describe que las bacteriocinas producidas por *Lc. lactis* M30 inhibían el desarrollo de la bacteria láctica alterante de la cerveza *Lb. brevis* BSH9 cuando este microorganismo se encontraba en este sustrato en pequeñas dosis (inóculo inicial 1×10^4 ufc/ml), pero que, sin embargo, si el inóculo inicial se aumentaba a 1×10^5 ufc/ml el efecto de las bacteriocinas era mínimo o, incluso, no se detectaba.

VI.1.5. ESTABILIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y L50B) DE *Enterococcus faecium* L50 EN DIVERSOS SUSTRATOS CERVECEROS

En este trabajo se evaluó la estabilidad de EntL50 (EntL50A y EntL50B) frente a los tratamientos térmicos llevados a cabo durante el proceso de elaboración de la cerveza, así como durante su almacenamiento con el objeto de determinar en que fase del proceso de fabricación de la cerveza podría adicionarse esta bacteriocina para impedir el desarrollo de las bacterias lácticas alterantes de este producto.

En primer lugar, se determinó la estabilidad de EntL50 (EntL50A y EntL50B) frente a los tratamientos térmicos empleados para la: (i) maceración, tratamientos térmicos sucesivos a 45, 62, 72 y 78°C durante 30 min en mosto sin lúpulo, (ii) ebullición, tratamiento térmico a 100°C durante 90 min en mosto con lúpulo, (iii) fermentación, tratamiento térmico a 15°C durante 6–10 días en mosto con lúpulo, y (iv) pasteurización, tratamientos térmicos a 65 y 75°C durante 40 y 10 min, respectivamente, en cerveza con alcohol (5% de etanol, vol/vol). Los resultados obtenidos demuestran que EntL50 (EntL50A y EntL50B) posee una elevada termorresistencia a los tratamientos térmicos llevados a cabo durante el proceso de elaboración de la cerveza, ya que, la actividad antimicrobiana residual de EntL50

(EntL50A y EntL50B) osciló entre un 62 y un 97% (Fig. 3.7; Tabla III.6). En segundo lugar, se determinó la estabilidad de EntL50 (EntL50A y EntL50B) durante su almacenamiento en cerveza a refrigeración (8°C) y temperatura ambiente (25°C), lo que puso de manifiesto que esta bacteriocina mantiene una actividad antimicrobiana residual del 88 y el 52%, respectivamente (Fig. 3.7; Tabla III.6). Los resultados descritos sugieren la posibilidad del empleo de EntL50 (EntL50A y EntL50B) como bioconservante de la cerveza en cualquier fase de su proceso de elaboración incluso en el producto elaborado y envasado. Conviene destacar que los resultados de este trabajo son más satisfactorios que los obtenidos por Vaughan *et al.* (2004), quienes describieron que las bacteriocinas producidas por *Lc. lactis* M30 pierden su actividad antimicrobiana después de 12 h de fermentación, a diferencia de NisA, y cuando se adicionan a mosto con lúpulo y se someten a ebullición. Sin embargo, al igual que en este trabajo, cuando estas bacteriocinas se someten a los tratamientos térmicos de pasteurización de la cerveza y almacenamiento a 30°C y refrigeración, su actividad antimicrobiana no resulta prácticamente afectada.

De forma general, existen tres estrategias para la aplicación de las bacteriocinas como bioconservantes alimentarios: (i) utilización como aditivo alimentario de la bacteriocina purificada o parcialmente purificada, (ii) adición como ingrediente alimentario de un medio fermentado por una cepa bacteriocinogénica e (iii) inoculación del alimento con una cepa bacteriocinogénica con la capacidad de producir bacteriocina(s) *in situ* (cultivo protector y/o cultivo iniciador) (sección II.3.4.10) (Abee *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Aymerich y Hugas, 1998; Ross *et al.*, 1999; Chikindas y Montville, 2002; Cotter *et al.*, 2005b; Deegan *et al.*, 2006; de Vuyst y Leroy, 2007; Gálvez *et al.*, 2007). En principio, una vez demostrada su inocuidad, cualquier bacteria láctica, cepa bacteriocinogénica y/o bacteriocina podría emplearse en la industria alimentaria bajo las dos primeras formas de aplicación; de hecho, las bacterias lácticas bacteriocinogénicas se han utilizado de forma empírica o inadvertidamente durante siglos en las fermentaciones alimentarias (Stiles, 1996). Sin embargo, el empleo de bacteriocinas como aditivos alimentarios está sujeto a la regulación de la lista positiva de estas sustancias y, en la actualidad, la única bacteriocina autorizada internacionalmente como aditivo antimicrobiano es NisA (conservante alimentario E-234). A este respecto, en la Unión Europea está permitida la utilización de NisA como conservante en determinados tipos de quesos, productos lácteos y postres. Asimismo, en Australia y Nueva Zelanda también está permitida su adición como conservante de la cerveza (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Riley y Wertz, 2002; Twomey *et al.*, 2002; Delves-Broughton, 2005). En este contexto, para que se acepte legalmente el empleo de una bacteriocina como aditivo alimentario se requieren numerosos estudios bioquímicos, genéticos y toxicológicos que suponen un coste económico muy importante (Schoeman *et al.*, 1999; Deegan *et al.*, 2006), lo que provoca que su empleo como bioconservante se realice mediante cualquiera de las otras dos estrategias mencionadas anteriormente. Por ello, la utilización como ingrediente alimentario de un sustrato alimentario fermentado por la cepa productora de bacteriocina(s) o la adición directa del microorganismo bacteriocinogénico al alimento, con la consiguiente producción *in situ* de la bacteriocina, representan estrategias de bioconservación muy interesantes, pues no llevan asociadas el coste económico y de tiempo que requiere el empleo y la autorización legal de las bacteriocinas como

aditivos alimentarios y, en el caso de la utilización del microorganismo bacteriocinogénico, proporciona una fuente de bacteriocina más duradera (McMullen y Stiles, 1996; Benkerroum *et al.*, 2002).

Con base en lo expuesto anteriormente, en este trabajo se hipotetizó sobre la posibilidad de emplear como cultivos iniciadores y protectores (bioconservantes) de la cerveza levaduras cerveceras recombinantes con la capacidad de producir bacteriocinas *in situ* durante la fermentación del mosto e inhibir, por tanto, el desarrollo de bacterias lácticas alterantes. En este contexto, se procedió a la obtención de cepas de laboratorio de *Sc. cerevisiae* productoras de EntL50 (EntL50A y/o EntL50B), lo que posiblemente permitirá en un futuro desarrollar levaduras cerveceras bacteriocinogénicas y evaluar la viabilidad y eficacia de su empleo como estrategia de bioconservación de la cerveza.

VI.2. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B) DE *Enterococcus faecium* L50 EN LEVADURAS

La clonación, expresión y producción funcional de bacteriocinas por hospedadores heterólogos puede permitir: (i) conocer la función de las proteínas codificadas por los genes de biosíntesis de las bacteriocinas, (ii) incrementar la producción de bacteriocinas, (iii) producir bacteriocinas en hospedadores más seguros, (iv) construir cepas productoras de varias bacteriocinas, (v) mejorar la adaptación de los hospedadores seleccionados para su implantación y desarrollo en diversos sustratos alimentarios y (vi) conferir una actividad antimicrobiana mayor o más específica a bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores, protectores y/o probióticos (sección II.6) (Fernández *et al.*, 2005a, b; Gutiérrez, 2005; Criado, 2006; Martín, 2006). Generalmente, los sistemas de expresión heteróloga de proteínas han utilizado *E. coli* como hospedador, ya que éste es el microorganismo mejor caracterizado genéticamente y existen numerosas herramientas genéticas disponibles para su manipulación; no obstante, su empleo para la producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas con fines alimentarios presenta limitaciones e inconvenientes (sección II.6) (Fernández *et al.*, 2005a, b). Las bacterias lácticas constituyen un hospedador heterólogo adecuado, ya que generalmente se consideran microorganismos seguros o de “grado alimentario” (*status* GRAS, del inglés *Generally Recognized as Safe*) y por la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (*status* QPS, del inglés *Qualified Presumption of Safety*). Por otra parte, diversas especies de levaduras (por ej.: *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris*) también resultan interesantes como hospedadores heterólogos para la producción de bacteriocinas con fines alimentarios, ya que se les pueden aplicar las técnicas de manipulación genética de procariotas y, además, gozan de la versatilidad de los sistemas eucariotas (Fernández *et al.*, 2005a, b).

En este trabajo se procedió a caracterizar molecularmente los mecanismos implicados en la secreción e inmunidad de EntL50 (EntL50A y EntL50B) en *E. faecium* L50, lo que podría facilitar la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B, independiente y conjuntamente, junto con su(s) proteína(s) de transporte/inmunidad en hospedadores heterólogos de interés para la industria

cervecera y alimentaria (*Sc. cerevisiae*) y la industria farmacéutica (*Pc. pastoris*). Los resultados obtenidos por Cintas *et al.* (1998a) y Criado (2006) demostraron que los determinantes genéticos responsables de la producción e inmunidad de EntL50A y EntL50B están ligados genéticamente y se localizan en el plásmido pCIZ1 (aprox., 50 kb). Asimismo, la determinación y el análisis de la secuencia nucleotídica de un fragmento de 21.446 pb de pCIZ1 reveló la presencia de 27 hipotéticos genes (ORFs, del inglés *Open Reading Frame*) organizados en cuatro regiones funcionales diferenciadas (Criado, 2006). El análisis de la secuencia nucleotídica de la región IV (*orf* 18–27) permitió determinar que contiene diez genes y está organizada en dos agrupaciones génicas con orientación contraria (*orf*18–19 y *orf*20–27) (Fig. 2.7). La primera agrupación génica está compuesta por los genes estructurales de EntL50B (*orf*18, *entL50B*) y EntL50A (*orf*19, *entL50A*), mientras que la segunda está constituida por ocho genes consecutivos (*orf*20–27). Los genes *orf*20 (*entL50C*), *orf*21 (*entL50D*) y *orf*22 (*entL50E*) codifican proteínas que no muestran homologías significativas con ninguna proteína descrita; sin embargo, *orf*23 (*entL50F*) codifica una proteína con homología con una proteína ya descrita pero con función desconocida. Por otra parte, los genes *orf*24 (*entL50G*), *orf*25 (*entL50H*), *orf*26 (*entL50I*) y *orf*27 (*entL50J*) codifican proteínas que presentan homología con proteínas que constituyen las diferentes subunidades de transportadores del tipo ABC y, por ello, se dedujo que EntL50GHJIJ constituye un nuevo transportador del tipo ABC compuesto por tres subunidades (dos subunidades de membrana [EntL50G y EntL50J] y una subunidad ATPasa [EntL50I]) y una proteína accesorio (EntL50H) (Criado, 2006). Es interesante destacar que EntL50GHJIJ muestra una elevada homología con el transportador adicional del tipo ABC As-48EFGH de *E. faecalis* S-48 (Díaz *et al.*, 2003), que está implicado en la inmunidad frente a la enterocina AS-48 (EntAS-48), junto con la proteína de inmunidad As-48D₁, y que coexiste con el transportador del tipo ABC As-48C₁D, dedicado exclusivamente al procesamiento y transporte de las moléculas de EntAS-48 recién sintetizadas, aunque también proporciona un nivel bajo de inmunidad (Díaz *et al.*, 2003). Análogamente, EntL50GHJIJ podría actuar confiriendo inmunidad frente a EntL50A y EntL50B. No obstante, no se puede descartar que EntL50GHJIJ también actúe como el transportador del tipo ABC dedicado a la secreción de EntL50A y EntL50B, ya que en las proximidades de *entL50A* y *entL50B* no se localizan genes que codifiquen ningún otro transportador del tipo ABC. Por otra parte, la organización genética de la agrupación génica de EntL50 (EntL50A y EntL50B) en pCIZ1 es muy similar a la descrita para EntAS-48 en pMB2 (Martínez-Bueno *et al.*, 1998; Díaz *et al.*, 2003), ya que ambas están compuestas por los genes estructurales de las bacteriocinas y 8–9 genes contiguos, de los que los cuatro últimos (EntL50GHJIJ y As-48EFGH) muestran una elevada homología y codifican un transportador del tipo ABC. En este sentido, los primeros cinco genes de la agrupación génica de EntAS-48 están implicados en la síntesis y modificación postraducciona del precursor de esta bacteriocina (*as-48A* y *as-48BC*, respectivamente), su secreción (*as-48C1* y *as-48D*) e inmunidad (*as-48D1*). De forma similar, los primeros seis genes de la agrupación génica de EntL50 están implicados en la síntesis de EntL50A y EntL50B (*entL50A* y *entL50B*) y, probablemente, en su secreción y en la inmunidad frente a esta bacteriocina (*entL50CDEF*). No obstante, el análisis de sus productos génicos (EntL50C, EntL50D, EntL50E y EntL50F) no permitió identificar rasgos típicos de transportadores del

tipo ABC, por lo que se hipotetizó que el transportador del tipo ABC EntL50GHIJ podría tener una función dual, estando implicado en la secreción y la inmunidad a esta bacteriocina (Criado, 2006), de forma similar al transportador MDR del tipo ABC LmrB de *Lc. lactis* BGM-1 (Gajic *et al.*, 2003), responsable del transporte e inmunidad a las bacteriocinas LsbA y LsbB que, al igual que EntL50A y EntL50B, se sintetizan sin extensión N-terminal (Gajic *et al.*, 2003). Considerando lo expuesto anteriormente, en este trabajo se procedió a la investigación de la función biológica de las proteínas codificadas por EntL50CDEF y EntL50GHIJ, con el objeto de determinar si está(n) involucradas en la inmunidad y/o el transporte activo de EntL50A y EntL50B al medio extracelular, respectivamente, lo que también protegería a *E. faecium* L50 del efecto tóxico de esta bacteriocina. Para lograr este objetivo se procedió (i) al aislamiento y la purificación del plásmido pCIZ1 de *E. faecium* L50 y la amplificación (fragmento A) de los genes estructurales de EntL50B (*orf18*, *entL50B*) y EntL50A (*orf19*, *entL50A*) y *orf20–27* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*); (ii) a la clonación del fragmento A en el vector pCRII-Blunt-TOPO (Invitrogen) y posterior transformación química de este plásmido recombinante en células competentes de *E. coli* One Shoot TOP-10 (Invitrogen); (iii) a la restricción enzimática de este plásmido recombinante y la clonación del fragmento A resultante en el vector de expresión pMG36e, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, y la estabilización del plásmido recombinante (pMG36e-A) mediante su electroporación en células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen); (iv) a la determinación de la secuencia nucleotídica del fragmento A de pMG36e-A y, por último, (v) al aislamiento, purificación y electroporación de pMG36e-A en cepas sensibles a EntL50A y EntL50B (*Lc. lactis* MG2097, *Lc. lactis* MG2101, *E. faecium* 14–2 y *E. faecium* P13) y en cepas resistentes a esta bacteriocina (*Lc. lactis* IL1403 y *E. faecalis* JH2–2). Conviene destacar que, para ninguna de estas cepas, se obtuvieron colonias transformantes con el plásmido recombinante y, por ello, no fue posible demostrar la función biológica de estas proteínas en el transporte y/o inmunidad de esta bacteriocina, lo que habría permitido evaluar la utilidad de estas proteínas para proceder a la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B, independiente y conjuntamente, en *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris*.

VI.2.1. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B) EN *Saccharomyces cerevisiae*

La primera levadura descrita como sistema de producción heteróloga de proteínas y péptidos es *Sc. cerevisiae* (Cregg *et al.*, 1993). *Sc. cerevisiae*, al igual que *E. coli*, es uno de los microorganismos mejor caracterizados genética y fisiológicamente y la consideración de la mayoría de las cepas como microorganismos seguros para las personas favorece su elección como hospedador para la producción heteróloga de proteínas y péptidos de interés. Además, en los últimos años, se han desarrollado plásmidos, vectores de integración cromosómica y diversos promotores y péptidos señal (SP, del inglés *Signal Peptide*) que permiten la expresión y secreción de proteínas, intrínsecas y extrínsecas a la

levadura, al medio extracelular (sección II.6.1) (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1989, 1990; Bardazzi y Casalone, 2004; Schuller y Casal, 2005; Cebollero *et al.*, 2007).

VI.2.1.1. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS pYABD01 PARA *Saccharomyces cerevisiae*

En la actualidad, diversos grupos de investigación han diseñado y empleado distintos vectores para la expresión y secreción heteróloga de diversas proteínas por *Sc. cerevisiae* (por ej.: pPRL2 y YEpFLAG-1) (Schoeman *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2000; van Reenen *et al.*, 2003). Sin embargo, este tipo de vectores no se encuentran disponibles comercialmente, por lo que en este trabajo se procedió al diseño y construcción de un nuevo vector a partir del vector de clonación/expresión de *Sc. cerevisiae* pYES-2 (5.856 pb) (Fig. 6.1.A) y del vector de clonación/expresión/secreción de *Pc. pastoris* pPICZ α A (3.593 pb) (Fig. 6.1.B). El vector pYES-2 presenta la capacidad de mantenerse como episomas en alto número de copias (10–40 copias/célula) y permite la expresión génica bajo el control del promotor del operón Gal1, inducible por galactosa y represible por glucosa, lo que posibilita un alto nivel de expresión génica; no obstante, no permite la secreción de las proteínas recombinantes expresadas por estas levaduras. Asimismo, este vector confiere a las cepas receptoras auxotróficas para el uracilo la capacidad de desarrollarse en ausencia de este compuesto. Por otra parte, el vector pPICZ α A contiene la región nucleotídica que codifica el SP requerido para la secreción de la feromona factor- α 1 (MF α 1_s, del inglés *Mating Pheromone α -factor Secretion Signal*) que induce la conjugación en determinadas cepas de *Sc. cerevisiae*, lo que permite la secreción de las proteínas recombinantes expresadas en *Pc. pastoris*; sin embargo, este vector no puede utilizarse en *Sc. cerevisiae*. MF α 1_s se ha convertido en una de las secuencias más empleadas para la secreción heteróloga de proteínas en *Sc. cerevisiae* y ha permitido la expresión y secreción de proteínas de diferente tamaño molecular (24–842 aa) (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1989, 1990; Cregg *et al.*, 1993; Ilgen *et al.*, 2005). De forma general, las proteínas solubles que no presentan sitios de glucosilación en su secuencia suelen expresarse y secretarse eficientemente si se fusionan a MF α 1_s; no obstante, la

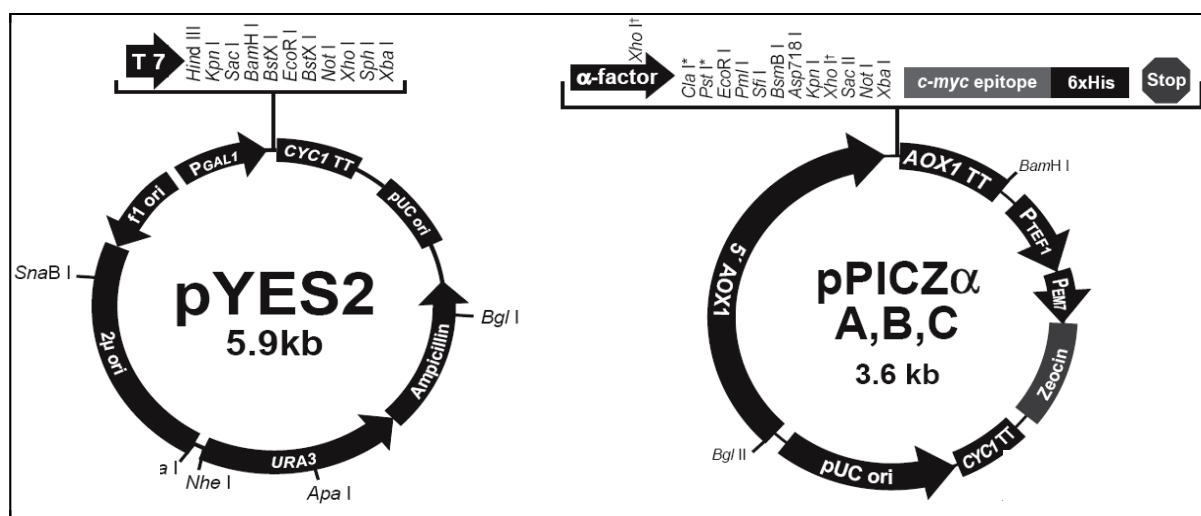


Figura 6.1. Mapa genético del vector de expresión de *Sc. cerevisiae* pYES-2 (A) y del vector de expresión y secreción de *Pc. pastoris* pPICZ α A (B). Adaptado de Invitrogen.

secreción de estas proteínas puede inhibirse en las que poseen un gran número de regiones hidrofóbicas (por ej.: dominios transmembrana) (Schuster *et al.*, 2000). Por todo ello, mediante la clonación de *MFaI_s* del vector pPICZαA en el vector de clonación/expresión de proteínas pYES-2 se obtuvo un nuevo vector de expresión y secreción de proteínas para *Sc. cerevisiae*, denominado pYABD01 (6.101 pb) (Fig.6.2), y se procedió a la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B, independiente y conjuntamente, en este hospedador eucariota.

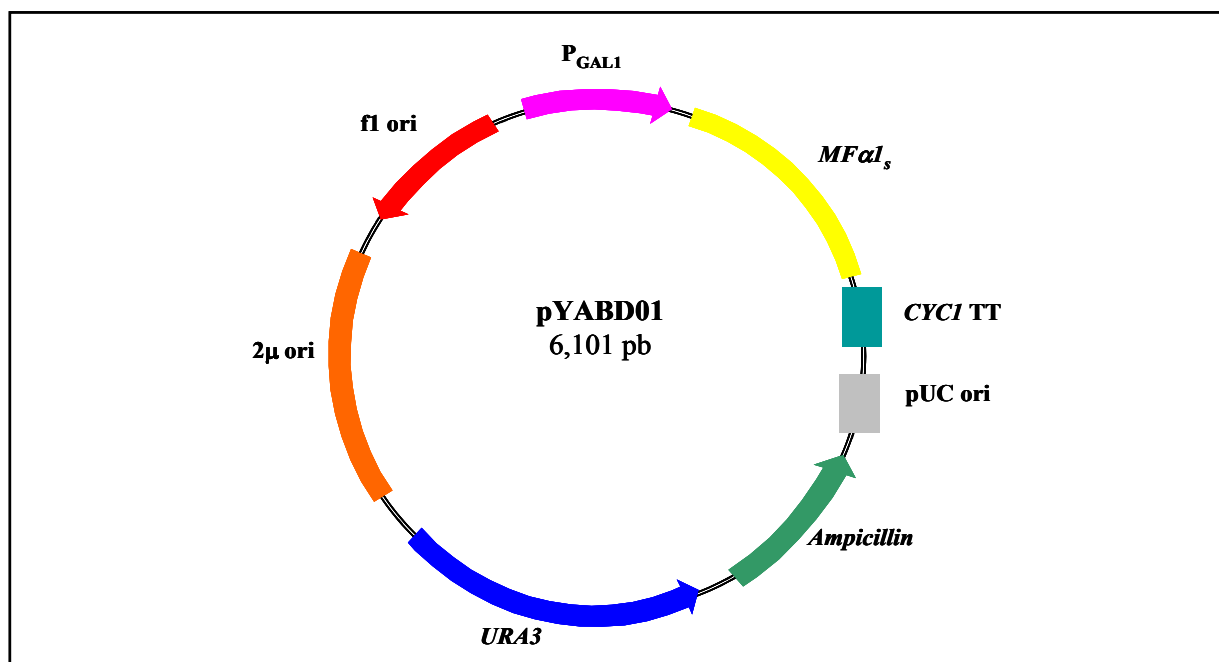


Figura 6.2. Mapa genético del vector de expresión y secreción de proteínas pYABD01 (6.101 pb) para *Sc. cerevisiae*.

VI.2.1.2. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B EN *Saccharomyces cerevisiae*

La clonación de *entL50A* y *entL50B*, independiente y conjuntamente (*entL50AB*), fusionados con *MFaI_s* en el vector de expresión y secreción de proteínas pYABD01 permitió la construcción de los plásmidos recombinantes pYABD02, pYABD03 y pYABD04, respectivamente (Figs. 4.1 y 6.3), para evaluar la producción de EntL50A y EntL50B, independiente y conjuntamente, por *Sc. cerevisiae*. La transformación posterior de estos plásmidos recombinantes en células competentes de *Sc. cerevisiae* INVSc1 tuvo como resultado la obtención de las levaduras recombinantes *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02), *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) y *Sc. cerevisiae* L50AB-27 (pYABD04).

Los resultados obtenidos demuestran que *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) poseen, respectivamente, la capacidad de expresar y secretar EntL50A y EntL50B biológicamente activos al medio extracelular (Fig. 4.2; Tabla IV.3). A pesar de que el desarrollo de estas levaduras recombinantes fue mayor en el medio complejo YPGR (DO₆₀₀= 8,5) que en el medio mínimo SCGR (DO₆₀₀= 4,8–5,1), la actividad antimicrobiana fue mucho menor (255 y 165 UB/mg masa celular seca [UB/mgMCS] en SCGR y 65 y 0 UB/mgMCS en YPGR, respectivamente) y la

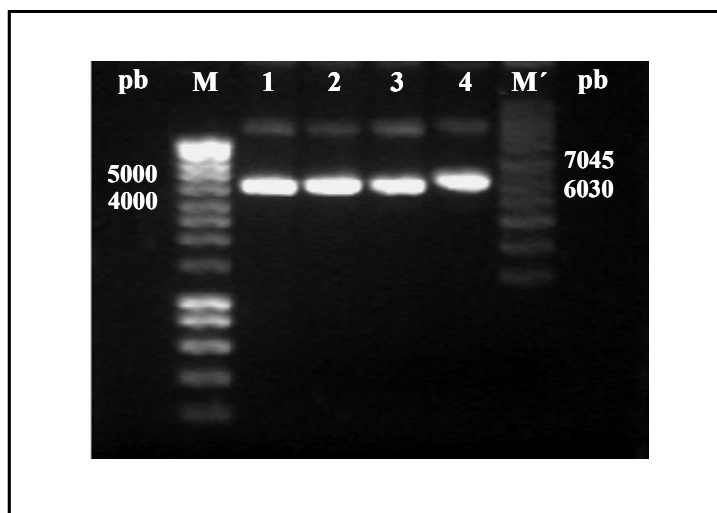


Figura 6.3. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos recombinantes pYABD01 (1), pYABD02 (2), pYABD03 (3) y pYABD04 (4). M, marcador de tamaño molecular Real Escala N° 1 (Durviz). M', marcador de tamaño molecular *Supercoiled DNA ladder* (Invitrogen).

máxima cantidad de EntL50A y EntL50B en el medio YPGR (5,2 y 19,1 ng/mg masa celular seca [ng/mgMCS], respectivamente) representó un 62 y un 80% de la máxima cantidad obtenida en el medio SCGR (8,4 y 24,0 ng/mgMCS, respectivamente). Las diferencias en la producción de estos péptidos puede deberse, al menos parcialmente, a la inestabilidad plasmídica de las levaduras recombinantes desarrolladas en YPGR por la ausencia de un factor de selección en este medio. Asimismo, Cintas *et al.* (1998a) determinaron que EntL50A y EntL50B son péptidos catiónicos y, por ello, pueden interaccionar electrostáticamente con las cargas negativas presentes en la superficie celular de las levaduras como se ha demostrado para otras bacteriocinas (Klaenhammer, 1988; Ray, 1992, Yang *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 2001; von Mollendorff *et al.*, 2007). Conviene destacar que, de forma general, la adsorción de bacteriocinas a las células del microorganismo productor es un mecanismo dependiente del pH, detectándose en la mayoría de los casos la máxima y mínima adsorción a pH 6,0–7,0 y 2,0–3,0, respectivamente (Yang *et al.*, 1992; von Mollendorff *et al.*, 2007). A este respecto, el pH final de los cultivos de *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) desarrollados en el medio SCGR fue menor que el obtenido en el medio YPGR (pH 3,0 y 6,0, respectivamente) y, por ello, la menor cantidad de EntL50A y EntL50B en este medio pudo deberse a una mayor adsorción a la superficie celular de las levaduras. Por otra parte, la menor actividad antimicrobiana de *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) en YPGR puede deberse, al menos parcialmente, a: (i) la mayor presencia de componentes del medio (por ej.: sal) o compuestos generados durante el desarrollo de estas levaduras (por ej.: colágeno) que pueden interferir en la actividad antimicrobiana de estos péptidos, como se ha descrito anteriormente para EntP, NisA y PedPA-1 (Schoeman *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a, b; Ilgen *et al.*, 2005; Sebban-Kreuzer *et al.*, 2006); (ii) la mayor agregación de los monómeros de los péptidos entre sí o con otros compuestos del medio dando lugar a

oligómeros con menor actividad antimicrobiana en los respectivos sobrenadantes (Schoeman *et al.*, 1999; Criado *et al.*, 2006b) y/o (iii) la mayor degradación de estos péptidos debido a una mayor producción de proteasas (por ej.: proteinasa A), como consecuencia de una mayor densidad y lisis celular (Schoeman *et al.*, 1999; Brey *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a; Criado *et al.*, 2006b). Por otra parte, *Sc. cerevisiae* posee la capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales de las proteínas secretadas, entre las que destacan: (i) maduración proteolítica, (ii) formación de enlaces disulfuro y (iii) glucosilación, que pueden producir la inactivación de la proteína secretada y/o una disminución en su actividad antimicrobiana, además de un reconocimiento antigénico diferente al de las proteínas “naturales” (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1990; Cereghino y Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). A este respecto, conviene destacar que EntL50A y EntL50B no presentan típicas secuencias de glucosilación en su molécula, por lo que es improbable que las diferencias cualitativas y cuantitativas de actividad antimicrobiana obtenidas en los medios SCGR e YPGR sean debidas a reacciones de glucosilación.

Los resultados de la Tabla IV.3 demuestran que la producción de EntL50A y EntL50B por las cepas recombinantes *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, es paralela al crecimiento celular (metabolitos primarios), ya que, una vez inducida por la adición de galactosa a los cultivos ($DO_{600}=2,0$), continúa durante la fase logarítmica de crecimiento y alcanza su valor máximo al final de dicha fase o al comienzo de la fase estacionaria, de forma similar a lo descrito para: (i) EntL50 de *E. faecium* L50, desarrollada en caldo MRS a diferentes temperaturas (Criado *et al.*, 2006b); (ii) EntP de *E. faecium* P13, producida heterológamente por cepas de *Methylobacterium extorquens* (Gutiérrez *et al.*, 2005b) y (iii) enterocina 1146 (EntA) (Parente y Hill, 1992), enterocina 900 (EntB) (Franz *et al.*, 1996) y enterocina 7C5 (enterocina AS-48) (Torri Tarelli *et al.*, 1994), pero contrariamente a lo descrito para la producción de EntB por *E. faecium* RZS C5 a valores de pH inferiores a 6,5, que está limitada al comienzo de la fase exponencial de crecimiento (Leroy y de Vuyst, 2002). La máxima cantidad de EntL50A producida por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) en los medios SCGR e YPGR fue 3–4 veces menor aproximadamente, que la máxima cantidad de EntL50B producida por *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03). Estas diferencias de producción pueden deberse a una mayor degradación proteolítica de EntL50A y/o una mayor secreción de EntL50B por este hospedador eucariota. A este respecto, otros estudios han demostrado que la eficiencia de secreción de este hospedador depende parcialmente de las características naturales de la proteína secretada (Cereghino y Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Cereghino *et al.*, 2002); no obstante, resulta improbable que este fenómeno sea responsable de estas diferencias de producción entre EntL50A y EntL50B ya que estos péptidos poseen secuencias aminoácidas muy similares (72% de identidad), presentan características fisicoquímicas parecidas (por ej.: tamaño molecular, carga eléctrica, punto isoelectrico [pI] e hidrofobicidad) y 31 de sus 44 y 43 aminoácidos, respectivamente, son idénticos, especialmente los del extremo N-terminal, incluidos los ocho primeros residuos aminoácidos (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d). Además, las proteínas hidrofóbicas (por ej.: las bacteriocinas) se insertan a las membranas de las células productoras (Schiffer *et al.*, 1992; Schoeman *et al.*, 1999). A este respecto, Cintas *et al.* (2000d) determinaron que EntL50A es un péptido más

hidrofóbico que EntL50B (grado de hidrofobicidad [GRAVY, del inglés *Grand Average of Hydropathicity*] de 0,202 y -0,144, respectivamente) y, por ello, puede producirse una mayor inserción de EntL50A a la membrana citoplasmática de la levadura.

Por otra parte, conviene destacar que EntL50A y EntL50B se producen en concentraciones equimolares en la cepa salvaje *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b) y que los resultados obtenidos en este estudio y en un trabajo previo (Cintas *et al.*, 1998a) demuestran que EntL50A y EntL50B sintetizados *in vitro* actúan sinérgicamente, siendo este sinergismo mayor cuando ambos péptidos se encuentran en concentraciones equimolares (Fig. 3.2; Tabla III.5). Por ello, se procedió a desarrollar una cepa con la capacidad de expresar y secretar conjuntamente EntL50A y EntL50B (*Sc. cerevisiae* L50AB [pYABD04]). La máxima actividad antimicrobiana de *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) se detectó después de 144 h de fermentación (300 UB/mgMCS) y la producción de EntL50A y EntL50B se evaluó mediante un ensayo inmunoenzimático, detectándose que la producción de EntL50A por *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) (10,4 ng/mgMCS) era un 24% mayor que la obtenida por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02); no obstante, esta levadura recombinante no produjo EntL50B. La secuenciación del fragmento α -L50A- α -L50B se realizó reiteradamente con el objeto de confirmar que el plásmido recombinante pYABD04 poseía las secuencias nucleotídicas correctas de *MF α 1_s-entL50A* y *MF α 1_s-entL50B*, aunque, sorprendentemente, la reacción de secuenciación se interrumpía siempre después del primer codón de *MF α 1_s*. Así pues, se procedió a la digestión del fragmento α -L50A- α -L50B con *HindIII-SmaI* y *SmaI-XbaI*, lo que permitió: (i) la obtención de los fragmentos α -L50A y α -L50B, respectivamente, (ii) la finalización de la secuenciación de ambos fragmentos y (iii) la demostración de que el plásmido pYABD04 contiene las secuencias correctas de *MF α 1_s-entL50A* y *MF α 1_s-entL50B*. Estos resultados, junto con la similitud de las características fisicoquímicas de EntL50A y EntL50B (Cintas *et al.*, 1998a), sugirieron la posible formación de estructuras secundarias de ADN en el fragmento α -L50A- α -L50B y, probablemente, en el ARNm, produciéndose el bloqueo en la expresión de *entL50B* a nivel transcripcional y traduccional y, concomitantemente, una mayor producción de EntL50A. A este respecto, otros estudios han demostrado que las estructuras secundarias inhiben el comienzo de la traducción en *Sc. cerevisiae* (Oliveira *et al.*, 1993; Vega-Laso *et al.*, 1993). Por otra parte, debido a que no fue posible la producción simultánea de EntL50A y EntL50B por una única cepa de *Sc. cerevisiae*, se procedió a su coproducción mediante el desarrollo de un cocultivo de *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (Fig. 4.3), lo que permitió demostrar que EntL50A y EntL50B pueden producirse en un mismo cultivo y que estos péptidos recombinantes coproducidos también actúan sinérgicamente, especialmente si se encuentran en concentraciones equimolares (Fig. 4.4).

Hasta la fecha, MF α 1_s de *Sc. cerevisiae* se ha empleado para la expresión y secreción heteróloga en este hospedador de dos bacteriocinas de la subclase IIa: (i) PedPA-1 de *P. acidilactici* PAC1.0 (Schoeman *et al.*, 1999) y (i) plantaricina 423 (Plt423) de *Lactobacillus plantarum* 423 (van Reenen *et al.*, 2003). En estos estudios, las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* expresaron y secretaron heterológamente estas bacteriocinas en medio sólido, bajo el control del promotor de la alcohol

deshidrogenasa ADH1; no obstante, en los sobrenadantes no concentrados de los cultivos de las levaduras recombinantes no se detectó actividad antimicrobiana, lo que se atribuyó a que PedPA-1 y Plt423 se mantenían asociadas a la membrana o a la pared celular de las células productoras. Asimismo, la falta de disponibilidad de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de estas bacteriocinas en los sobrenadantes de los cultivos productores no permitió determinar la relación existente entre las concentraciones de PedPA-1 y Plt423 y su actividad biológica, probablemente disminuida por: (i) una posible glucosilación de las moléculas, (ii) la actividad de enzimas proteolíticas, (iii) la agregación entre sí o a otras moléculas y/u (iv) otras razones bioquímicas o biofísicas no determinadas aún (Schoeman *et al.*, 1999; van Reenen *et al.*, 2003).

Por otra parte, conviene destacar que a pesar de que la cantidad de EntL50A (8,4 ng/mgMCS) y EntL50B (24 ng/mgMCS) producida por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, desarrolladas en el medio mínimo SCGR a 30°C sólo representó un 4 y un 11% de la máxima cantidad producida por la cepa salvaje *E. faecium* L50 desarrollada en el medio complejo MRS a 25°C (217 y 210 ng/mgMCS, respectivamente) (Criado *et al.*, 2006b), los sobrenadantes de estas levaduras recombinantes pudieron utilizarse para la purificación a homogeneidad de EntL50A y EntL50B mediante cromatografía (sección VI.2.1.3), ya que el empleo de sobrenadantes de la cepa salvaje *E. faecium* L50 no permitió separar ambos péptidos debido a que, como se mencionó anteriormente, presentan una gran similitud en su secuencia aminoacídica (72% de identidad) y en sus características fisicoquímicas (Cintas *et al.*, 1995, 1998a).

VI.2.1.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B PRODUCIDAS HETERÓLOGAMENTE POR *Saccharomyces cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) Y *Saccharomyces cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), RESPECTIVAMENTE

El protocolo de purificación de bacteriocinas que mayor difusión ha alcanzado en el campo de las bacteriocinas de las bacterias lácticas se basa en el pequeño tamaño molecular, la naturaleza catiónica y la relativa hidrofobicidad de las bacteriocinas (secciones II.3.4.5) (Nissen-Meyer *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 2001). Este protocolo incluye: (i) el desarrollo de la cepa bacteriocinogénica en un medio líquido bajo condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas, (ii) la obtención del correspondiente sobrenadante libre de células, (iii) la precipitación de las proteínas mediante adición de sulfato amónico y, por último, (iv) diversas etapas cromatográficas, entre las que incluyen las cromatografías de intercambio iónico (aniónico o catiónico), interacción hidrofóbica y fase inversa en un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Chromatography*). Asimismo, algunos autores han descrito una variante de este protocolo que incluye una etapa cromatográfica de filtración en gel previa al intercambio catiónico (Cintas, 1995; Cintas *et al.*, 1997; Casaus *et al.*, 1997; Herranz *et al.*, 2001d).

La purificación de EntL50A y EntL50B producidos por las cepas recombinantes *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, desarrolladas en el medio mínimo SCGR, se realizó empleando el protocolo descrito por Cintas *et al.* (1995) para la purificación de EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por la cepa salvaje *E. faecium* L50

desarrollada en el medio complejo MRS. No obstante, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que las proteínas obtenidas tras la etapa de precipitación con sulfato amónico de las proteínas de los correspondientes sobrenadantes se adsorbieron débilmente a la matriz de intercambio catiónico, contrariamente a lo ocurrido para EntL50 producida por la cepa salvaje. Por ello, se procedió a repetir el proceso de purificación incluyendo una etapa cromatográfica de filtración en gel, previa al intercambio catiónico, lo que permitió una recuperación del 82 y el 64% de la actividad de EntL50A y EntL50B obtenida en las fracciones de precipitación con sulfato amónico. La precipitación con sulfato amónico tiene como objetivo la concentración de las proteínas del sobrenadante de los cultivos bacteriocinogénicos; dado que durante esta precipitación, además de las bacteriocinas, coprecipitan un gran número de proteínas “contaminantes”, en su mayoría procedentes del medio de cultivo, éstas deben eliminarse en etapas sucesivas del proceso de purificación. La precipitación de las proteínas de los sobrenadantes de *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) permitió la obtención, tras su centrifugación, de tres fracciones bien diferenciadas: un precipitado, una película flotante y un sobrenadante. La presencia de esta película flotante se ha detectado tras la precipitación con sulfato amónico de otras bacteriocinas como EntA producida por *E. faecium* PLBC21 (Martín *et al.*, 2007a), EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995), EntP producida por *E. faecium* P13 (Casaus, 1998) e hiracina JM79 (HirJM79) producida por *Enterococcus hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2007b) y, dado que puede llegar a contener hasta el 97% de la bacteriocina inicial (Muriana y Klaenhammer, 1991), debe recogerse y mezclarse con el precipitado. No obstante, a pesar de recoger esta película flotante, la actividad total de las fracciones obtenidas durante la purificación de EntL50A y EntL50B fue aproximadamente 8 y 4 veces menor, respectivamente, que la obtenida durante la purificación de EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995). Este resultado podría deberse, al menos en parte, a una menor cantidad de proteínas en los sobrenadantes de los cultivos desarrollados en el medio mínimo SCGR que en el medio complejo MRS y, por ello, a una menor coprecipitación de estos péptidos con compuestos proteicos del medio. Por otra parte, la cromatografía de filtración en gel es una técnica cromatográfica introducida con éxito en el proceso de purificación de algunas bacteriocinas como EntA producida por *E. faecium* P21 (Herranz *et al.*, 2001b) y PLBC21 (Martín *et al.*, 2007a), EntP producida por *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997; Casaus, 1998) y *Pc. pastoris* X-33t₁ (Gutiérrez *et al.*, 2005a), HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2007b) y PedPA-1 producida por *P. acidilactici* 347 (Martínez *et al.*, 1998) con el objeto de eliminar las sales que interfieren negativamente en la cromatografía de intercambio catiónico, ya que inhiben la unión de las bacteriocinas (péptidos poco catiónicos y de pequeño tamaño molecular) a los ligandos aniónicos unidos covalentemente a la matriz cromatográfica. A pesar de realizar esta etapa de purificación, los rendimientos de EntL50A y EntL50B obtenidos para *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, tras la cromatografía de intercambio catiónico fueron muy bajos (0,8 y 0%, respectivamente) (Tabla IV.4), lo que podría deberse a la débil naturaleza catiónica de estos péptidos o a su naturaleza hidrofóbica, que causaría su retención en las matrices cromatográficas, originando pérdidas del 40–80% tras la cromatografía de intercambio iónico (Venema *et al.*, 1997). Sin embargo,

la recuperación de la actividad antimicrobiana tras la cromatografía de interacción hidrofóbica fue del 10 y el 5,9% (Tabla IV.4), respectivamente, lo que representó una actividad mayor que la obtenida tras la cromatografía de intercambio catiónico. No obstante, este fenómeno también se ha detectado, en diversas etapas cromatográficas, durante la purificación de otras bacteriocinas como EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995), PedPA-1 producida por *P. acidilactici* Z102 (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), EntP producida por *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997), EntA producida por *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996) y PLBC21 (Martín *et al.*, 2007a) y SakA y sakacina P (SakP) producidas por *Lactobacillus curvatus* LTH1174 y *Lb. curvatus* LTH673, respectivamente (Tichaczek *et al.*, 1992) e HirJM79 producida por *E. hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2007b). Por último, los rendimientos obtenidos tras la cromatografía de fase inversa fueron del 1,3 y el 2,6% (Tabla IV.4) para *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, y, en ambos casos, se obtuvo una única fracción final con actividad antimicrobiana. Por otra parte, el incremento de la actividad antimicrobiana específica de estas fracciones con respecto a la de los sobrenadantes fue mayor en *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) que en *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (2.000 y 452 veces, respectivamente). De forma general, el hecho de que la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas tras la cromatografía de interacción hidrofóbica sea mayor que tras la cromatografía de interacción catiónica puede deberse a que durante el proceso de purificación se eliminan compuestos inhibidores de la actividad biológica de estos péptidos antimicrobianos o bien porque los medios apolares favorecen su actividad biológica (Casas, 1998; Cintas *et al.*, 1998a; Herranz, 2001). Por otra parte, las cantidades finales de EntL50A y EntL50B obtenidas tras la cromatografía de fase inversa fueron de 8,6 y 23,5 µg, respectivamente, lo que representa un 46,5 y un 45,8% de las cantidades obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos iniciales. Con base en los resultados descritos puede considerarse que la escasa adsorción de EntL50A y EntL50B a la matriz de cromatografía de intercambio catiónico constituye el factor limitante para la purificación de estos péptidos a partir de los sobrenadantes de los cultivos de las respectivas levaduras recombinantes (Tabla IV.4). Por todo ello, aunque la expresión y producción heteróloga de EntL50A y EntL50B por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, ha permitido la purificación de estos péptidos de forma independiente convendría proceder a la optimización del método de purificación con el objeto de incrementar aún más su rendimiento.

El análisis mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS) de la fracción que contenía EntL50B producida por *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) permitió identificar: (i) un péptido con una masa molecular idéntica a la de EntL50B producido por *E. faecium* L50 (5.178 Da) (Cintas *et al.*, 1998a), lo que demuestra que el péptido recombinante es procesado correctamente por la enzima Kex2, y (ii) dos péptidos de mayor tamaño (5.242 y 5.226 Da) (Fig. 4.5.B), que podrían ser el resultado de modificaciones espontáneas de los residuos de metionina (Met) presentes en la molécula de EntL50B (Met1 y Met24) (Cintas *et al.*, 1998a). A este respecto, si ambos residuos Met se oxidan a metionina sulfona (MetSO₂) se produciría una adición de 64 Da y se obtendría una masa molecular de 5.242 Da. Asimismo, el péptido de 5.226 Da podría resultar de la conversión de un residuo Met a MetSO₂.

(adición de 32 Da) y la conversión del otro residuo a metionina sulfóxido (MetSO) (adición de 16 Da). Por otra parte, el análisis mediante MALDI-TOF-MS de la fracción que contenía EntL50A producida por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (Fig. 4.5.A) reveló la presencia de tres fragmentos con una elevada masa molecular (6,2–6,4 kDa). En un principio, este resultado podría indicar que EntL50A no había sido procesado correctamente por la enzima Kex2, como consecuencia de una reducción del reconocimiento de su sitio de unión (Glu-Lys-Arg), debido a interferencias conformacionales ejercidas por el extremo N-terminal de EntL50A; sin embargo, el análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de EntL50A y EntL50B permitió descartar esta hipótesis ya que los ocho primeros aminoácidos de estos péptidos son idénticos (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d). Por ello, es posible hipotetizar sobre la asociación de EntL50A a un compuesto o material producido por la levadura, como se ha descrito previamente para PedPA-1 producida heterológicamente por *Pc. pastoris* (Beaulieu *et al.*, 2005). En este contexto, estos autores demostraron que PedPA-1 se asociaba a material colágeno y que, a diferencia de EntL50A y EntL50B, no mostraba actividad biológica. Asimismo, considerando la similitud de la secuencia de EntL50A y EntL50B, puede hipotetizarse que uno o ambos residuos Met de EntL50A también se han oxidado a MetSO y/o MetSO₂, respectivamente. A este respecto, conviene destacar que Met es un aminoácido que reacciona con mucha facilidad con el oxígeno, lo que genera péptidos y proteínas con una menor actividad biológica (Brot y Weissbach, 1991; Weissbach *et al.*, 2002). Así pues, estudios recientes han demostrado que los residuos Met de las bacteriocinas pueden oxidarse de manera espontánea, especialmente durante su purificación a homogeneidad, perdiendo o reduciendo su actividad antimicrobiana (Casaus *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1999b; Johnsen *et al.*, 2000; Cintas *et al.*, 2000d). Por ello, el hecho de que las fracciones obtenidas tras la purificación de EntL50A y EntL50B mostraran una actividad antimicrobiana mucho menor a la de los correspondientes sobrenadantes de los cultivos puede deberse a la oxidación de sus residuos Met. Así pues, las cantidades de EntL50A y EntL50B obtenidas tras la cromatografía de fase inversa fueron aproximadamente la mitad de la detectadas en los correspondientes sobrenadantes de los cultivos (46,5 y 45,8%, respectivamente); sin embargo, la actividad antimicrobiana de estas fracciones representó una recuperación de tan sólo el 1,3 y el 2,6%, respectivamente. A este respecto, conviene destacar que el proceso de elaboración de la cerveza incluye una etapa en la que el mosto lupulado se oxigena (sección II.1.4.2.5), permitiendo el desarrollo de la levadura cervecera y el inicio de la fermentación (Vaughan *et al.*, 2005), lo que podría representar un problema para la aplicación de EntL50 (EntL50A y EntL50B) como bioconservante de la cerveza debido a su susceptibilidad a la oxidación. No obstante, existe la posibilidad de desarrollar por ingeniería genética variantes de EntL50A y EntL50B con una mayor estabilidad frente a la oxidación mediante la sustitución de los residuos Met por otros aminoácidos siempre que esto no implique la pérdida o reducción de su actividad antimicrobiana, al igual que se ha descrito para PedPA-1 (Johnsen *et al.*, 2000). A este respecto, debería evaluarse exhaustivamente el efecto en la actividad antimicrobiana de la sustitución del residuo Met₂₄ por otros aminoácidos ya que la región C-terminal de las bacteriocinas está implicada en el modo de acción de las mismas debido a que se integra en la membrana citoplasmática de la célula diana, lo que provoca la formación de poros y, en última instancia, la muerte celular (Fimland *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b;

Miller *et al.*, 1998; Fimland *et al.*, 2000; Johnsen *et al.*, 2000; Fimland *et al.*, 2002; Kazazic *et al.*, 2002; Johnsen *et al.*, 2005a).

Por otra parte, los análisis en geles de Tricina-SDS-poliacrilamida de las fracciones que contenían EntL50A producida por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y EntL50B producida por *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (Fig. 4.6.A) revelaron sendas bandas proteicas que correspondían a EntL50A y EntL50B y dos o una banda(s) superior(es), respectivamente, lo que demuestra que estos péptidos tienen una fuerte tendencia a formar agregados. Mediante experiencias similares, Cintas *et al.* (1995), demostraron que EntL50 producida por la cepa salvaje *E. faecium* L50, que de hecho contenía EntL50A y EntL50B, migró como un péptido de 3.600 Da; sin embargo, EntL50A y EntL50B recombinantes migraron como péptidos de 7.000 Da aproximadamente, lo que podría deberse a que: (i) las bandas visualizadas en el gel correspondían a dímeros de EntL50A y EntL50B recombinantes y/o (ii) estos péptidos migran de manera distinta si se analizan electroforéticamente independiente o conjuntamente, como resultado de cambios en la conformación de las moléculas debidos a interacciones entre ambos péptidos. Por otra parte, EntL50A, EntL50B y sus agregados se detectaron mediante *Western blotting* (Fig. 4.6.B) y mostraron ser biológicamente activos mediante un *Overlay assay* (Fig. 4.6.C). Estos resultados demuestran que el transporte y secreción de EntL50A, así como el procesamiento, transporte y secreción de EntL50B, producidos heterológamente por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente, se realiza adecuadamente y que estos péptidos recombinantes podrían ser similares a los producidos por la cepa salvaje *E. faecium* L50.

Los resultados descritos anteriormente demuestran la utilidad y eficacia del vector de expresión y secreción de proteínas pYABD01, diseñado en este trabajo, para la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B biológicamente activos en *Sc. cerevisiae*. Asimismo, la disponibilidad de estas cepas bacteriocinogénicas de *Sc. cerevisiae*, un microorganismo de gran actividad metabólica, puede resultar de gran interés para: (i) el desarrollo de levaduras cerveceras bacteriocinogénicas, que podrían emplearse como cultivos iniciadores y protectores (bioconservantes) de la cerveza, con la capacidad de producir estos péptidos *in situ* durante la fermentación del mosto e inhibir, por tanto, el desarrollo de las bacterias lácticas alterantes, (ii) la obtención de una elevada cantidad de estos péptidos con el objeto de proceder a la evaluación de su utilización como bioconservantes en la industria cervecera y alimentaria y (iii) la evaluación del mecanismo molecular de acción de estos péptidos. No obstante, sería necesario desarrollar previamente nuevas metodologías que mejoren la actividad antimicrobiana y producción de EntL50A y EntL50B por estos hospedadores, lo que podría realizarse mediante: (i) la utilización de vectores de expresión con un mayor número de copias en el hospedador (Gorgens *et al.*, 2004); (ii) el empleo de promotores más activos e inducidos por etanol (por ej.: ADH1) (Schoeman *et al.*, 1999; Gorgens *et al.*, 2004); (iii) la utilización de secuencias de iniciación de la traducción diferentes a la secuencia Kozak (Kozak, 1992); (iv) la incorporación de aminoácidos cargados positivamente en el extremo N-terminal del SP (Tsuchiya *et al.*, 2003), (v) el empleo de hospedadores deficientes en la síntesis de proteasas y/o (vi) su desarrollo en fermentadores, bajo diferentes condiciones ambientales (temperatura, pH, agitación, aireación, etc.) y en recipientes de cultivo con un

diseño novedoso (Sreekrishna *et al.*, 1997; Trucksis *et al.*, 1997; Villate *et al.*, 2001; Cereghino *et al.*, 2002). Por último, conviene destacar que la utilización de estas levaduras recombinantes en la industria cervecera y/o alimentaria requerirá que se hayan empleado para su construcción vectores de expresión de “grado alimentario” y que estas cepas hospedadoras estén reconocidas como “seguras” (*status* GRAS y/o QPS) y de utilidad industrial.

VI.2.2. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B) EN *Pichia pastoris*

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la utilidad y eficacia del vector de expresión y secreción de proteínas pYABD01 para la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B en *Sc. cerevisiae*; no obstante, la máxima cantidad de estos péptidos producida por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* (pYABD03), respectivamente, sólo representó un 4 y un 11% de la máxima cantidad producida por la cepa salvaje *E. faecium* L50 en el medio MRS, respectivamente, y este hospedador no permitió la producción conjunta de EntL50A y EntL50B (sección VI.2.1.2). A este respecto, conviene destacar que la utilización de *Sc. cerevisiae* como hospedador heterólogo no siempre se considera ideal para la producción de proteínas recombinantes y, por ello, el empleo de levaduras metilotróficas constituye una alternativa de elección para solventar los inconvenientes de *Sc. cerevisiae* derivados de: (i) su bajo nivel de producción, (ii) su inestabilidad, (iii) su alto grado de glucosilación y/o (iv) su difícil adaptación a ensayos de tipo industrial (Hollenberg y Gellissen, 1997).

Pc. pastoris es la levadura metilotrófica más utilizada como modelo para el desarrollo de sistemas de producción heteróloga de proteínas (hasta la fecha se han expresado aproximadamente 400 proteínas en este hospedador) debido a una serie de factores entre los que destacan: (i) la simplicidad de las técnicas para su manipulación genética; (ii) la habilidad para producir, intracelular y extracelularmente, grandes cantidades de proteínas recombinantes; (iii) la capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales en estas proteínas (por ej.: glucosilaciones, formación de enlaces disulfuro y maduración proteolítica) y (iv) la disponibilidad de sistemas de expresión heteróloga comerciales (Cereghino y Cregg, 1999, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Sebban-Kreuzer *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). De forma general, el empleo de *Pc. pastoris* como hospedador heterólogo permite la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes (aprox., 10–100 veces mayores que en *Sc. cerevisiae*), así como la adaptabilidad de los ensayos de laboratorio a las condiciones industriales (Cregg *et al.*, 1993; Cereghino y Cregg, 2000). Por todo ello, en este trabajo se procedió a la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B, independiente y conjuntamente, en esta levadura metilotrófica con el objeto de producir grandes cantidades de estos péptidos que permitan evaluar su posible empleo como ingrediente alimentario en la industria cervecera y alimentaria, así como, entre otros aspectos, determinar el mecanismo molecular de acción de estos péptidos antimicrobianos.

VI.2.2.1. EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LAS ENTEROCINAS L50A Y/O L50B EN *Pichia pastoris*

El vector de expresión y secreción de *Pc. pastoris* pPICZ α A (3.593 pb) (Fig. 6.1.B) se seleccionó para la producción heteróloga de EntL50A y EntL50B, independiente y conjuntamente, debido a una serie de características estructurales y funcionales, entre las que destacan: (i) MF α 1_s, que permite la secreción de las proteínas recombinantes expresadas en *Pc. pastoris* a través del sistema Sec (también denominado Ruta General de Secreción); (ii) P_{AOX1}, promotor inducible por metanol que permite la sobreexpresión de los genes que se encuentran bajo su control y (iii) AOX1, secuencia nucleotídica que facilita la integración del vector linearizado en el genoma de *Pc. pastoris*, incrementa la estabilidad de las proteínas recombinantes y/o permite la construcción de cepas con varias copias del gen recombinante (Brake *et al.*, 1984; Cregg *et al.*, 1993; Cereghino y Cregg, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005a). A este respecto, la enzima alcohol oxidasa (AOX) está codificada por dos genes, AOX1 y AOX2; no obstante, el primer gen es responsable de la mayoría de la actividad AOX en la célula. Además, P_{AOX1} permite la sobreexpresión de AOX1 y la producción de cantidades de AOX que constituyen más del 30% de la proteína total soluble (Cereghino y Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). Por otra parte, MF α 1_s es el SP más utilizado para la secreción heteróloga de proteínas en este hospedador debido a que su efectividad es mayor que la del SP de las correspondientes proteínas (Cereghino y Cregg, 2000), especialmente para las proteínas de pequeño tamaño molecular (Sreekrishna *et al.*, 1997). Conviene destacar que estos autores recomiendan la conservación de los espaciadores constituidos por la repetición de los aminoácidos contiguos ácido glutámico-alanina (Glu-Ala), adyacentes a los nucleótidos que codifican el lugar de procesamiento de la enzima Kex2, cuando se fusionan proteínas a MF α 1_s; sin embargo, estos espaciadores no se incluyeron en este trabajo ya que se ha demostrado la secreción de proteínas eficiente empleando únicamente los nucleótidos que codifican el lugar de procesamiento de la enzima Kex2 (Brake *et al.*, 1984). Por todo ello, *entL50A* y *entL50B* se clonaron, independiente y conjuntamente, en el vector pPICZ α A, fusionados con MF α 1_s, obteniéndose los plásmidos recombinantes pBAS01, pBAS02 y pBAS03, respectivamente (Fig. 5.1). Asimismo, la transformación de estos plásmidos recombinantes en células competentes de *Pc. pastoris* permitió la obtención de las levaduras recombinantes *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) y *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03).

Los resultados obtenidos (Fig. 5.2) demuestran que *Pc. pastoris* X-33A (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B (pBAS02) y *Pc. pastoris* X-33AB (pBAS03) poseen una amplia y potente actividad antimicrobiana en medio sólido y líquido cuando se desarrollan en los medios mínimo y complejo (BMM y BMMY, respectivamente). A pesar de que el desarrollo de estas levaduras recombinantes fue mayor en el medio complejo BMMY (DO₆₀₀ = 9,2–10,9) que en el medio mínimo BMM (DO₆₀₀ = 8,2–8,6), la actividad antimicrobiana de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) fue menor (310 y 65 UB/mgMCS en BMM y 100 y 20 UB/mgMCS en BMMY, respectivamente) y la máxima cantidad de EntL50A, así como EntL50A y EntL50B, en el medio BMMY (31 ngEntL50A/mgMCS, así como 3 ngEntL50A/mgMCS y 5,9 ngEntL50B/mgMCS,

respectivamente) representó un 14%, así como un 9 y un 15% de la máxima cantidad obtenida en el medio BMM (228,5 ngEntL50A/mgMCS, así como 32,8 ngEntL50A/mgMCS y 39,3 ngEntL50B/mgMCS, respectivamente). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) fue mayor en el medio BMMY (50 y 95 UB/mgMCS en BMM y BMMY, respectivamente) y la máxima cantidad de EntL50B en este medio (1.240 ng/mgMCS) fue 2,6 veces mayor que en el medio BMM (475 ng/mgMCS). La menor cantidad de EntL50A en los sobrenadantes de los cultivos de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) desarrollados en el medio BMMY podría deberse a una mayor adsorción de este péptido a la superficie celular de la levadura productora. A este respecto, Cintas *et al.* (1998a) determinaron que EntL50A es un péptido catiónico y, por ello, puede interaccionar electrostáticamente con las cargas negativas presentes en la superficie celular de las levaduras mediante un mecanismo dependiente del pH, como se ha sugerido para las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* productoras de EntL50A y EntL50B obtenidas en este trabajo (sección VI.2.1.2) y demostrado para la producción de otras bacteriocinas por las correspondientes cepas salvajes (Klaenhammer, 1988; Ray, 1992, Yang *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 2001; von Mollendorff *et al.*, 2007). En este sentido, el pH final de los cultivos de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) desarrollados en el medio BMMY fueron mayores que los obtenidos en el medio BMM (pH 6,0 y 3,0, respectivamente) y, por ello, la menor cantidad de EntL50A en el medio BMMY pudo deberse a una mayor adsorción de este péptido a la superficie celular de las levaduras. No obstante, esta menor cantidad de EntL50A también puede deberse a uno de los siguientes factores: (i) la mayor agregación de los monómeros de los péptidos entre sí o con otros compuestos del medio dando lugar a oligómeros con un reducido reconocimiento antigénico (Schoeman *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a; Ilgen *et al.*, 2005; Criado *et al.*, 2006b) y/o (ii) la mayor degradación de la región C-terminal de este péptido debido a una mayor actividad de las proteasas neutras, como consecuencia de un mayor pH y una mayor densidad y lisis celular de la levadura productora desarrollada en el medio BMMY (Schoeman *et al.*, 1999; Brey *et al.*, 2003; Beaulieu *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005a; Criado *et al.*, 2006b). Asimismo, estas diferencias en la actividad proteásica dependiente del medio de cultivo podrían ser responsables, al menos parcialmente, de que la actividad antimicrobiana y cantidad de EntL50A disminuya un 60 y un 85%, respectivamente, después de alcanzarse los valores máximos en los cultivos desarrollados en el medio BMMY, pero sólo un 30 y un 35%, respectivamente, en los cultivos desarrollados en el medio BMM. Por otra parte, *Pc. pastoris*, al igual que *Sc. cerevisiae* (sección VI.2.1.2), posee la capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales de las proteínas secretadas, entre las que destacan: (i) maduración proteolítica, (ii) formación de enlaces disulfuro y (iii) glucosilación, que pueden producir la inactivación de la proteína secretada y/o una disminución en su actividad antimicrobiana, además de un reconocimiento antigénico diferente al de las proteínas “naturales” (Brake *et al.*, 1984; Brake, 1990; Cereghino y Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). A este respecto, conviene destacar que EntL50A y EntL50B no presentan típicas secuencias de glucosilación en su molécula, por lo que es improbable que las diferencias

cualitativas y cuantitativas de actividad antimicrobiana obtenidas en los medios BMM y BMMY sean debidas a reacciones de glucosilación.

Los resultados de la Tabla V.3 demuestran que la producción de EntL50A y EntL50B, así como de EntL50A y EntL50B, por las levaduras recombinantes *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) y *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03), respectivamente, es paralela al crecimiento celular (metabolitos primarios), ya que, una vez inducida por la adición de metanol a los cultivos ($DO_{600}=1$), continúa durante la fase logarítmica de crecimiento y alcanza su valor máximo durante dicha fase o al comienzo de la fase estacionaria, de forma a similar a lo descrito para EntL50A y EntL50B producidos heterológamente por *Sc. cerevisiae* (sección VI.2.1.2), EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por la cepa salvaje *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b) y otras bacteriocinas (Parente y Hill, 1992; Torri Tarelli *et al.*, 1994; Franz *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 2005b). La máxima cantidad de EntL50B producida por *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) desarrollada en BMMY a 30°C (1.240 ng/mgMCS) representó un incremento de 5,9 veces respecto a la máxima producción de EntL50B por la cepa salvaje *E. faecium* L50 desarrollada en el medio complejo MRS a 25°C (210 ng/mgMCS) (Criado *et al.*, 2006b). Además, aunque la máxima cantidad de EntL50B producida por *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) desarrollada en BMM a 30°C fue menor (475 ng/mgMCS), esta producción fue 2,3 veces mayor que la de la cepa salvaje. Por el contrario, la máxima cantidad de EntL50A producida por *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) desarrollada en BMM a 30°C (228,5 ng/mgMCS) fue similar a la producida por *E. faecium* L50 (210 ng/mgMCS) (Criado *et al.*, 2006b).

Independientemente del medio de cultivo, el desarrollo de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) ($DO_{600}= 8,6$ y $10,9$ en BMM y BMMY, respectivamente) fue mayor que el de *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) ($DO_{600}= 8,4$ y $9,8$ en BMM y BMMY, respectivamente); sin embargo, la máxima cantidad de EntL50A obtenida en los sobrenadantes de los cultivos de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) desarrollados en BMM y BMMY (228,5 y 31 ng/mgMCS, respectivamente) fue 2 y 40 veces menor, respectivamente, que la máxima cantidad de EntL50B obtenida en los sobrenadantes de los cultivos de *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) desarrollados en los mismos medios (475 y 1.240 ng/mgMCS, respectivamente). En un principio, estas diferencias podrían deberse a una mayor degradación proteolítica de la región C-terminal de EntL50A, así como a una mayor expresión de *entL50B* y secreción de EntL50B. En este contexto, diversos estudios han demostrado que en el cromosoma de *Pc. pastoris* pueden integrarse múltiples copias del ADN recombinante mediante el gen *AOX1*, lo que permite una mayor expresión génica (Sreekrishna *et al.*, 1997; Cereghino y Cregg, 2000; Ilgen *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que la eficiencia de secreción de una proteína en este hospedador depende en parte de las características naturales de la proteína heteróloga (Cereghino y Cregg, 2000; Schuster *et al.*, 2000; Cereghino *et al.*, 2002); no obstante, resulta improbable que este fenómeno sea responsable de las diferencias en las cantidades de EntL50A y EntL50B obtenidas en los respectivos sobrenadantes, debido a que: (i) estos péptidos son muy parecidos (72% de homología en su secuencia aminoacídica), presentan características fisicoquímicas similares (por ej.: tamaño molecular, carga eléctrica, pI e hidrofobicidad) y presentan 31 aminoácidos idénticos, especialmente en la región N-terminal, incluidos los ocho primeros aminoácidos (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d), y (ii)

EntL50A y EntL50B son producidas en cantidades similares por la levadura recombinante *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) (Tabla V.3). Además, otros estudios han demostrado que proteínas o péptidos hidrofóbicos (por ej.: EntL50A y EntL50B) pueden insertarse a la membranas de las células productoras (sección VI.2.1.2) (Schiffer *et al.*, 1992; Schoeman *et al.*, 1999). A este respecto, Cintas *et al.* (2000d) determinaron que EntL50A es un péptido más hidrofóbico que EntL50B (índices GRAVY 0,202 y -0,144, respectivamente) y, por ello, puede producirse una mayor inserción de EntL50A en la membrana citoplasmática de la levadura después de su adsorción dependiente del pH a la superficie celular, lo que también podría explicar la menor cantidad de este péptido en los sobrenadantes correspondientes.

Por otra parte, la construcción de la levadura recombinante *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03) permitió la producción conjunta de EntL50A y EntL50B; no obstante, las cantidades de EntL50A y EntL50B producidas en los medios BMM y BMMY fueron 7–10 y 12–210 menores, respectivamente, que las producidas por *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectivamente. A este respecto, otros estudios han demostrado que las cepas multi-bacteriocinogénicas producen bacteriocinas en cantidades menores a las obtenidas en las cepas salvajes productoras de una sola bacteriocina (Horn *et al.*, 1998; Criado *et al.*, 2006b; Gutiérrez *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007a). Asimismo, estas diferencias podrían deberse a un menor número de copias de *entL50A* y *entL50B* integradas en el cromosoma de *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03). Conviene destacar que EntL50A y EntL50B se producen en concentraciones equimolares en *Pc. pastoris* X-33AB-27 (pBAS03), de forma similar a lo descrito en la cepa salvaje *E. faecium* L50 (Criado *et al.*, 2006b), y que estos péptidos actúan sinérgicamente, siendo su efecto sinérgico mayor cuando ambos péptidos se encuentran en concentraciones equimolares (grado de sinergismo de 5,4 y 2,8 en BMM y BMMY, respectivamente), de forma similar a los resultados obtenidos para las levaduras recombinantes de *Sc. cerevisiae* (Figs. 3.2 y 4.4; Tabla III.5) y en un trabajo previo (Cintas *et al.*, 1998a).

Hasta la fecha, la expresión y secreción heteróloga de bacteriocinas en *Pc. pastoris* sólo se ha demostrado para las bacteriocinas pertenecientes a la subclase IIa EntP de *E. faecium* P13 (Gutiérrez *et al.*, 2005a), PedPA-1 de *P. acidilactici* PAC1.0 (Beaulieu *et al.*, 2005) e HirJM79 de *E. hirae* DCH5 (Sánchez *et al.*, 2008). A este respecto, se ha descrito la expresión heteróloga de PedPA-1 por *Pc. pastoris* pero asociada a material colágeno, no detectándose actividad biológica en los respectivos sobrenadantes. Por otra parte, Gutiérrez *et al.* (2005a) y Sánchez *et al.* (2008) demostraron la producción heteróloga de EntP e HirJM79 biológicamente activas, respectivamente, por cepas recombinantes de *Pc. pastoris* desarrolladas en los medios BMM y BMMY. Independientemente del medio de cultivo, las cepas bacteriocinogénicas de *Pc. pastoris* productoras de EntP, HirJM79, EntL50A, EntL50B y EntL50A y EntL50B mostraron un desarrollo similar; sin embargo, la máxima cantidad de EntP e HirJM79 se obtuvo al inicio de la fase logarítmica ($DO_{600}=1,7-3,3$), mientras que la máxima cantidad de EntL50A y EntL50B se detectó al inicio de la fase estacionaria ($DO_{600}=7,8-10,2$) y en la parte intermedia de la fase logarítmica ($DO_{600}=4,8-7,2$), respectivamente. Conviene

destacar que estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo para las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* (sección VI.2.1.2). Además, la actividad biológica y producción de EntP por *Pc. pastoris* X-33t₁ e HirJM79 por *Pc. pastoris* X-33TH disminuyó rápidamente, no detectándose actividad antimicrobiana (en el medio BMM) o siendo esta muy baja (1,5 o 45% de la máxima actividad antimicrobiana en el medio BMMY, respectivamente) en los sobrenadantes de los cultivos de estas levaduras recombinantes tras 10 y 12 h de incubación, respectivamente, probablemente debido a la degradación de estas bacteriocinas por la acción de proteasas neutras (Gutiérrez *et al.*, 2005a; Sánchez *et al.*, 2008). Por el contrario, EntL50A y EntL50B mostraron una mayor estabilidad, especialmente en el medio BMM, siendo destacable el hecho de que la cantidad y actividad antimicrobiana específica residuales obtenidas para estos péptidos 24 y 96 h después de que se alcanzasen los valores máximos, respectivamente, representaban un 71 y un 43%, así como un 93 y un 50%, respectivamente (Tabla V.3).

VI.2.2.2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENTEROCINAS L50A Y L50B PRODUCIDAS HETERÓLOGAMENTE POR *Pichia pastoris* X-33A-22 (pBAS01) Y *Pichia pastoris* X-33B-33 (pBAS02), RESPECTIVAMENTE

La expresión y producción heteróloga de EntL50A y EntL50B por las levaduras recombinantes *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectivamente, desarrolladas en el medio BMMY permitió la purificación de ambos péptidos de forma independiente. Para ello, se empleó un protocolo similar al descrito en la sección VI.2.1.3 debido a que este protocolo posibilitó la purificación de EntL50A y EntL50B producidos heterológamente por cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* (sección VI.2.1.3). Así pues, la precipitación con sulfato amónico permitió una recuperación del 65 y el 68% de las cantidades de EntL50A y EntL50B obtenidas en los sobrenadantes de los cultivos, respectivamente, y un incremento en la actividad antimicrobiana específica del 14 y el 27%, respectivamente (Tabla V.4). A continuación, estas fracciones se sometieron a cromatografía de filtración en gel con el objeto de eliminar sales que pudieran interferir negativamente en la subsiguiente cromatografía de intercambio catiónico (sección VI.2.1.3). A este respecto, las cantidades de EntL50A y EntL50B recuperadas tras de la cromatografía de intercambio catiónico fueron del 50 y el 55%, respectivamente, detectándose un incremento en la actividad antimicrobiana específica de 102 y 12 veces, respectivamente (Tabla V.4). Asimismo, las fracciones obtenidas de las columnas de interacción hidrofóbica representaron una recuperación del 67 y el 15% de la actividad antimicrobiana inicial de EntL50A y EntL50B, respectivamente, obteniéndose una mayor recuperación de EntL50B que en la etapa anterior, lo que coincide con los resultados obtenidos para las levaduras recombinantes de *Sc. cerevisiae* (sección VI.2.1.3). Por último, en las fracciones de purificación obtenidas tras la cromatografía de fase inversa se obtuvo, en ambos casos, una única fracción final con actividad antimicrobiana. Las cantidades finales de EntL50A y EntL50B en estas fracciones fueron de 24 y 6,5 µg, respectivamente, lo que representó un 21 y un 7,2% de las cantidades de los sobrenadantes de los cultivos, y estas fracciones mantuvieron un 43 y un 5% de la actividad antimicrobiana inicial (Tabla V.4). Conviene destacar que la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas tras la precipitación con sulfato amónico representó un incremento de 1,3 y 2,5 veces con respecto a la de los

sobrenadantes de los cultivos lo que puede deberse a la eliminación de compuestos inhibidores de la actividad antimicrobiana de estos péptidos y/o a un aumento de su actividad debido a la presencia de sales y/o compuestos hidrofóbicos en estas fracciones. A este respecto, este fenómeno también se ha descrito durante la purificación de EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por *E. faecium* L50 (Cintas *et al.*, 1995), así como en la purificación de PedPA-1 producida por *P. acidilactici* Z102 (Nieto-Lozano *et al.*, 1992; Cintas *et al.*, 1998b), EntA producida por *E. faecium* CTC492 (Aymerich *et al.*, 1996), EntP producida por *E. faecium* P13 (Cintas *et al.*, 1997) y SakA y SakP producidas por *Lb. curvatus* LTH1174 y *Lb. curvatus* LTH673, respectivamente (Tichaczek *et al.*, 1992). Por el contrario, tras la cromatografía de intercambio catiónico de EntL50B se detectó una disminución reversible del 90% de su actividad antimicrobiana (7,5% de la actividad antimicrobiana inicial); no obstante, la actividad antimicrobiana de este péptido se duplicó tras la cromatografía de interacción hidrofóbica. La reducción de la actividad antimicrobiana de EntL50B podría deberse a una disminución de la interacción electrostática de este péptido con la superficie celular de la levadura, por la inhibición ejercida por las elevadas concentraciones de sal del tampón de elución (NaCl 1M). Además, tras las cromatografías de interacción hidrofóbica y fase inversa se obtuvo una reducida adsorción de EntL50B a las matrices correspondientes (33 y 7,2%, respectivamente), lo que pudo deberse a la baja hidrofobicidad de este péptido (índice GRAVY -0,144) y, por ello, estas etapas cromatográficas representaron el factor limitante para la purificación de grandes cantidades de EntL50B producidas por *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02).

El análisis mediante MALDI-TOF-MS de la fracción que contenía EntL50B producida por *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) mostró: (i) un péptido mayoritario con una masa molecular idéntica a la de EntL50B producido por *E. faecium* L50 (5.178 Da) (Cintas *et al.*, 1998a), lo que demuestra que el péptido recombinante es procesado correctamente por la enzima Kex2, y (ii) otro péptido de menor tamaño (5.194 Da) (Fig. 5.4.B), que podría ser el resultado de una modificación espontánea de uno de los dos residuos Met presentes en la molécula de EntL50B (Met1 o Met24) (sección VI.2.1.3) (Cintas *et al.*, 1998a). A este respecto, si un residuo Met se oxida a MetSO se produciría una adición de 16 Da y se obtendría una masa molecular de 5.194 Da. Por otra parte, el análisis mediante MALDI-TOF-MS de la fracción que contenía EntL50A producida por *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (Fig. 5.4.A) reveló un péptido minoritario con una masa molecular similar a la de EntL50A producido por *E. faecium* L50 (5.190 Da) y la presencia de cinco péptidos con una elevada masa molecular (6,2–6,9 kDa). En un principio, estos resultados podrían indicar que la mayor parte de EntL50A no había sido procesada correctamente por la enzima Kex2, como consecuencia de una reducción del reconocimiento de su sitio de unión (Glu-Lys-Arg), debido a interferencias conformacionales ejercidas por el extremo N-terminal de EntL50A; sin embargo, el análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de EntL50A y EntL50B permitió descartar esta hipótesis ya que los ocho primeros aminoácidos de estos péptidos son idénticos (Cintas *et al.*, 1998a, 2000d). Por ello, es posible hipotetizar sobre la asociación de EntL50A a un compuesto o material producido por la levadura, como se ha descrito previamente para PedPA-1 producida heterológamente por *Pc. pastoris* (Beaulieu *et al.*, 2005) y EntL50A producido heterológamente por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (Fig. 4.5) (sección VI.2.1.3).

Asimismo, considerando la similitud de las secuencias de EntL50A y EntL50B puede hipotetizarse que uno o ambos residuos Met de EntL50A se han oxidado a MetSO y/o MetSO₂, respectivamente.

EntL50A y EntL50B producidos heterológamente por *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectivamente, se caracterizaron mediante geles de Tricina-SDS-poliacrilamida, *Western blotting* y *Overlay assay* (Fig. 5.5) y los resultados obtenidos determinaron la fuerte tendencia de estos péptidos a formar agregados, probablemente debido a interacciones hidrofóbicas. En los geles de Tricina-SDS-poliacrilamida, EntL50A y EntL50B migraron como péptidos de aproximadamente 7.000 Da (Fig. 5.5.A) mientras que EntL50 (EntL50A y EntL50B) producida por la cepa salvaje *E. faecium* L50 migró como un péptido de 3.600 Da (Cintas *et al.*, 1995). Estas diferencias podrían deberse a que: (i) las bandas visualizadas en el gel correspondían a dímeros de EntL50A y EntL50B recombinantes y/o (ii) estos péptidos migran de manera distinta si se analizan electroforéticamente independiente o conjuntamente, como resultado de cambios en la conformación de las moléculas debidos a interacciones entre ambos péptidos. Además, estos péptidos recombinantes y sus agregados se detectaron mediante *Western blotting* (Fig. 5.5.B), empleando anticuerpos de especificidad predeterminada frente a estos péptidos; sin embargo, únicamente los péptidos recombinantes mostraron actividad biológica mediante un *Overlay assay* (Fig. 5.5.C), contrariamente a lo obtenido para EntL50A y EntL50B producidos heterológamente por *Sc. cerevisiae* (Fig. 4.6.C), lo que podría deberse a una mayor cantidad de estos péptidos en *Sc. cerevisiae*. Estos resultados demuestran que el procesamiento, transporte y secreción de EntL50A y EntL50B, producidos heterológamente por *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectivamente, se realiza adecuadamente y que estos péptidos recombinantes podrían ser similares a los producidos por la cepa salvaje *E. faecium* L50.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la capacidad de las cepas recombinantes de *Pc. pastoris* para la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B biológicamente activos, independiente y conjuntamente. La construcción de estas cepas bacteriocinogénicas puede facilitar futuras aplicaciones de EntL50 (EntL50A y EntL50B) en la industria cervecera, alimentaria y farmacéutica, de forma similar a otros fármacos y enzimas derivadas de levaduras metilotróficas recombinantes que se encuentran disponibles comercialmente o a la espera de su comercialización (Hollenberg y Gellissen, 1997; Gellissen, 2000). Asimismo, la producción y purificación independiente de EntL50A y EntL50B puede permitir conocer los mecanismos involucrados en su modo de acción debido a que para la aplicación de microorganismos bacteriocinogénicos y/o sus bacteriocinas en estas industrias se requiere un conocimiento exhaustivo del mecanismo por el que ejercen su efecto bactericida. A pesar de los resultados obtenidos en este trabajo, sería necesario la investigación de nuevas estrategias experimentales que permitan optimizar la producción y purificación de estos péptidos, lo que podría realizarse mediante: (i) la integración en el cromosoma de este hospedador del número de copias adecuado para cada gen (Sreekrishna *et al.*, 1997); (ii) el empleo de secuencias de iniciación de la traducción diferentes a la secuencia Kozak (Kozak, 1992); (iii) la incorporación de aminoácidos cargados positivamente en el extremo N-terminal del SP (Tsuchiya *et al.*, 2003); (iv) la utilización de hospedadores deficientes en la síntesis de proteasas, así como, el empleo de medios de

cultivo no tamponizados que permitan la inactivación de las proteasas neutras, aumentar la estabilidad proteolítica y reducir la adsorción de las proteínas secretadas a la célula productora (Sreekrishna *et al.*, 1997; Trucksis *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2006); (v) la utilización de uracilo como factor de selección para evitar la acción mutagénica de la zeocina (Sreekrishna *et al.*, 1997; Cereghino y Cregg, 2000); (vi) el empleo de fuentes de carbono que aumenten la masa celular de la levadura y que no repriman la inducción del promotor por metanol (Sreekrishna *et al.*, 1997); (vii) el desarrollo en fermentadores bajo diversas condiciones ambientales (temperatura, pH, agitación, aireación, etc.) (Cereghino *et al.*, 2002); (viii) la utilización de recipientes de cultivo con diseño novedoso (Villate *et al.*, 2001) y/o, en algunas aplicaciones de la industria alimentaria, (ix) el empleo de promotores no inducibles por metanol como GAP, FLD1, PEX8 e YPT1 (Cereghino y Cregg, 1999, 2000; Ilgen *et al.*, 2005).

VI.2.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE *Saccharomyces cerevisiae* Y *Pichia pastoris* COMO HOSPEDADORES HETERÓLOGOS PARA LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN HETERÓLOGA DE LA ENTEROCINA L50 (L50A Y/O L50B)

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la capacidad de las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris* para la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B biológicamente activos, independiente y/o conjuntamente (secciones VI.2.1.2 y VI.2.2.1). Estas levaduras son microorganismos eucariotas de gran actividad metabólica, por lo que la disponibilidad de cepas bacteriocinogénicas puede resultar de gran interés para su empleo como factorías celulares que permitan obtener elevadas cantidades de EntL50A y EntL50B con el objeto de proceder a la evaluación de su utilización como bioconservantes de la industria cervecera, en particular, y la industria alimentaria, en general. Así pues, las cepas bacteriocinogénicas de *Sc. cerevisiae* pueden resultar de gran interés para el futuro desarrollo de levaduras cerveceras bacteriocinogénicas con la capacidad de producir estos péptidos antimicrobianos *in situ* durante la fermentación del mosto e inhibir, por tanto, el desarrollo de las bacterias lácticas alterantes (cultivos iniciadores y/o protectores). Por otra parte, las cepas bacteriocinogénicas de *Pc. pastoris* podrían utilizarse para la obtención de una elevada cantidad de EntL50A y EntL50B con el objeto de proceder a la evaluación de su utilización como bioconservantes y/o como factorías celulares para la producción de grandes cantidades de estos péptidos y proceder, entre otros estudios, a la evaluación de los mecanismos involucrados en su modo de acción.

Conviene destacar que los resultados de actividad antimicrobiana y producción de EntL50A y/o EntL50B por las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris* fueron diferentes, tanto cualitativa como cuantitativamente; no obstante, en ambos hospedadores las cantidades de EntL50B fueron entre 2 y 40 veces mayores que las obtenidas para EntL50A (secciones VI.2.1.2 y VI.2.2.2). Por otra parte, la máxima cantidad de EntL50A y EntL50B en los sobrenadantes de *Pc. pastoris* fue 27 y 52 veces mayor, respectivamente, que la obtenida en los respectivos sobrenadantes de *Sc. cerevisiae*; sin embargo, su actividad antimicrobiana específica fue 21 y 71 veces menor, respectivamente (Figs. 4.2, 5.3 y 6.4; Tablas IV.3, V.3 y VI.4). La estabilidad de EntL50A producido por cepas recombinantes de

Sc. cerevisiae y *Pc. pastoris*, desarrolladas en los medios mínimos SCGR y BMM, respectivamente, fue muy similar debido a que la cantidad de este péptido 24 h después de que se alcanzase el valor máximo representaba un 75 y un 71%, respectivamente; sin embargo, la estabilidad de EntL50B fue mayor en *Sc. cerevisiae* (73%) que en *Pc. pastoris* (43%) 96 h después de que se alcanzase su cantidad máxima. Por otra parte, el empleo de *Sc. cerevisiae* como hospedador no permitió la producción conjunta de EntL50A y EntL50B por una misma cepa recombinante; no obstante, la producción de EntL50A por *Sc. cerevisiae* L50AB-2 (pYABD04) fue un 24% mayor que la obtenida por *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02). Sin embargo, los resultados obtenidos en *Pc. pastoris* demostraron la consecución de la producción conjunta de EntL50A y EntL50B por una misma cepa recombinante, aunque las cantidades de estos péptidos fueron menores a las obtenidas cuando EntL50A y EntL50B se produjeron de forma independiente (Tabla V.3). Asimismo, esta levadura multibacteriocinogénica permitió demostrar el efecto sinérgico de EntL50A y EntL50B, principalmente cuando estos péptidos se encuentran en concentraciones equimolares, de forma similar a los resultados obtenidos para las levaduras recombinantes de *Sc. cerevisiae* (sección VI.2.1.2) y en un trabajo previo (Cintas *et al.*, 1998a).

Tabla VI.4. Máxima producción y actividad antimicrobiana de EntL50A y EntL50B expresadas y secretadas por levaduras recombinantes de *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris*

Péptido antimicrobiano	<i>Sc. cerevisiae</i> INVSc1				<i>Pc. pastoris</i> X-33			
	Medio de cultivo ^a	t (h) ^b	Conc ^c	AA (SC) ^d	Medio de cultivo	t (h)	Conc	AA (S) ^d
EntL50A	SCGR	144	8,4	255	BMM	192	228,5	310
EntL50B	SCGR	120	24,0	165	BMMY	144	1.240,0	95

^aMedio de cultivo óptimo para la producción de EntL50A y EntL50B.

^bTiempo de incubación expresado en horas, en el que se obtuvo la máxima producción y actividad antimicrobiana de EntL50A y EntL50B.

^cProducción máxima de EntL50A o EntL50B determinada mediante un ELISA-NCI empleando anticuerpos policlonales de especificidad predeterminada frente a EntL50A o EntL50B y expresada en ng/mgMCS.

^dActividad antimicrobiana determinada mediante EPM empleando como microorganismo indicador *P. damnosus* CECT4797 y expresada en UB/mgMCS. SC, sobrenadante concentrado; S, sobrenadante.

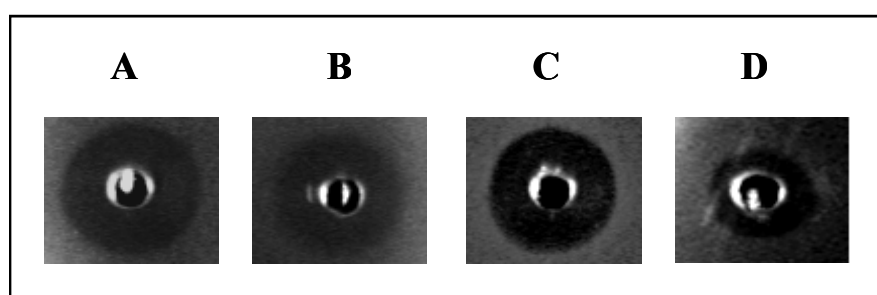


Figura 6.4. Actividad antimicrobiana máxima de los sobrenadantes de los cultivos de las levaduras recombinantes *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) (A), *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (B), *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) (C) y *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02) (D) desarrollados en los medios SCGR (A y B), BMM (C) y BMMY (D) a 30°C.

Por otra parte, conviene destacar que la producción heteróloga de EntL50A y EntL50B por levaduras recombinantes de *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris* permitió la purificación de estos péptidos de forma independiente, lo que resulta de gran interés ya que el empleo de sobrenadantes de la cepa salvaje *E. faecium* L50 para la purificación de EntL50 (EntL50A y EntL50B) no permitió separar ambos péptidos debido a la gran similitud de su secuencia aminoacídica (72% de identidad) y sus características fisicoquímicas (Cintas *et al.*, 1995, 1998a). Los resultados obtenidos tras la purificación de estos péptidos en ambos hospedadores mostraron diferencias significativas (Tablas IV.4 y V.4). A este respecto, tras la precipitación con sulfato amónico de las proteínas de los sobrenadantes de las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* desarrolladas en el medio mínimo BMM se detectó una gran disminución de la actividad antimicrobiana de EntL50A y EntL50B (90 y 80%, respectivamente), lo que podría deberse a la menor cantidad de proteínas presentes en los respectivos sobrenadantes y, por ello, una menor coprecipitación de estos péptidos con los compuestos proteicos del medio. La cromatografía de filtración en gel es una técnica introducida con éxito en el proceso de purificación de algunas bacteriocinas (sección VI.2.1.3) con el objeto de eliminar las sales que interfieren negativamente en la cromatografía de intercambio catiónico. A pesar de realizar esta etapa cromatográfica durante las purificaciones de estos péptidos producidos por *Sc. cerevisiae* se detectó una reducida o nula adsorción de EntL50A y EntL50B, respectivamente, a la matriz de la cromatografía de intercambio catiónico, debido probablemente a que las sales de amonio (NH_4^+) presentes en el tampón de elución pueden inhibir la unión de estos péptidos catiónicos de pequeño tamaño molecular a los ligandos aniónicos unidos covalentemente a la matriz cromatográfica (Cintas *et al.*, 2000d) y/o la menor cantidad de estos péptidos en los sobrenadantes de los cultivos de *Sc. cerevisiae* desarrollados en el medio SCGR. Con base en estos resultados, la purificación de EntL50A y EntL50B producidos heterológamente por cepas recombinantes de *Pc. pastoris* se realizó a partir de cultivos desarrollados en el medio complejo BMMY, lo que permitió, tras la precipitación con sulfato amónico, una recuperación del 65 y el 68% de las cantidades de EntL50A y EntL50B obtenidas en los correspondientes sobrenadantes de los cultivos, respectivamente, así como una actividad antimicrobiana mayor (Tabla V.4). Asimismo, se obtuvo una actividad antimicrobiana de EntL50A mayor que en *Sc. cerevisiae* tras la cromatografía de intercambio catiónico (73% frente a 0,8%); sin embargo, se detectó una reducida actividad antimicrobiana de EntL50B (7,5%) aunque mayor a la obtenida para la cepa recombinante *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) (0%). No obstante, los rendimientos de EntL50A y EntL50B purificados de los sobrenadantes de los cultivos de *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01) y *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectivamente, fueron 2 y 6 veces menores que los obtenidos de *Sc. cerevisiae* L50A-20 (pYABD02) y *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03), respectivamente; sin embargo, la actividad antimicrobiana específica de los cultivos fue 60 y 6 veces mayor, respectivamente.

Los análisis mediante MALDI-TOF-MS de EntL50A y EntL50B purificados de las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris* fueron muy similares (Figs. 4.5 y 5.4). Así pues, en las fracciones que contenían EntL50B se identificó un péptido minoritario (en *Sc. cerevisiae* L50B-4 [pYABD03]) o mayoritario (en *Pc. pastoris* X-33B-33 [pBAS02]) con una masa molecular idéntica a

la de EntL50B producido por *E. faecium* L50 (5.178 Da) y otros péptidos en los que los dos o un residuo Met (Met1 y/o Met24) se encuentran oxidados a MetSO y/o MetSO₂ en *Sc. cerevisiae* L50B-4 (pYABD03) y MetSO en *Pc. pastoris* X-33B-33 (pBAS02), respectivamente (Figs. 4.5.B y 5.4.B). Por otra parte, en las fracciones que contenían EntL50A se identificó un péptido minoritario con una masa molecular similar a la de EntL50A producido por *E. faecium* L50 (5.190 Da) en *Pc. pastoris* X-33A-22 (pBAS01), así como varios péptidos con una elevada masa molecular (6,2–6,9 kDa) en ambos hospedadores (Figs. 4.5.A y 5.4.A), lo que sugiere que EntL50A puede asociarse a un compuesto o material producido por la levadura (por ej.: colágeno) (secciones VI.2.1.3 y VI.2.2.2). La actividad antimicrobiana específica de EntL50A y EntL50B producidos por las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* se redujo considerablemente durante el proceso de purificación, obteniéndose tan sólo un 2,6 y un 5,5% de la actividad antimicrobiana específica de los correspondientes sobrenadantes de los cultivos, respectivamente, lo que podría deberse a la oxidación de ambos residuos Met. Por el contrario, la actividad antimicrobiana específica de estos péptidos producidos por las cepas recombinantes de *Pc. pastoris* representó un 205 y un 75 % de la obtenida en los correspondientes sobrenadantes de los cultivos, lo que sugiere que la oxidación de un residuo Met en EntL50A y EntL50B no reduce su actividad antimicrobiana. Considerando estos resultados y los de los análisis mediante MALDI-TOF-MS, puede hipotetizarse que sólo el residuo Met1 se ha oxidado en EntL50A y EntL50B producidos por las cepas recombinantes de *Pc. pastoris*, ya que la zona C-terminal de las bacteriocinas está implicada en el modo de acción de las mismas debido a que se integra en la membrana citoplasmática de la célula diana, lo que provoca la formación de poros y, en última instancia, la muerte celular (sección VI.2.1.3). Por otra parte, los resultados obtenidos mediante ensayos en geles de Tricina-SDS-poliacrilamida, *Western blotting* y *Overlay assay* de EntL50A y EntL50B producidos por estas levaduras recombinantes fueron muy similares (Figs. 4.6 y 5.5), lo que, junto con los resultados descritos anteriormente, demuestran que el procesamiento, transporte y secreción de EntL50A y EntL50B se realiza adecuadamente en las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris* y que estos péptidos podrían ser similares a los producidos por la cepa salvaje *E. faecium* L50.

Las levaduras recombinantes obtenidas en este trabajo podrían emplearse como factorías celulares experimentales para la expresión y secreción heteróloga de EntL50A y EntL50B biológicamente activos, independiente y conjuntamente, ya que, como se ha mencionado anteriormente, estos péptidos poseen un gran interés tecnológico para su utilización como bioconservantes de la industria cervecera, en particular, y la industria alimentaria, en general. Asimismo, los resultados descritos sugieren la posibilidad de desarrollar levaduras cerveceras bacteriocinogénicas que pudieran emplearse como cultivos iniciadores y protectores (bioconservantes) de la cerveza con la capacidad de producir bacteriocinas *in situ* durante la fermentación del mosto e inhibir, por tanto, el desarrollo de las bacterias lácticas alterantes de este producto. No obstante, la utilización industrial de estas levaduras requeriría que se hayan empleado para su construcción vectores de expresión de “grado alimentario” y que estas cepas hospedadoras estén reconocidas como “seguras” (*status* GRAS y/o QPS) y de utilidad industrial. Por otra parte, la disponibilidad del vector de clonación, expresión y secreción de proteínas diseñado y

construido en este trabajo (pYABD01) puede permitir, en un futuro inmediato, la producción heteróloga de otras bacteriocinas y/o péptidos de interés para las industrias cervecera, alimentaria y/o farmacéutica. Finalmente, la producción y purificación independiente de EntL50A y EntL50B por las cepas recombinantes de *Sc. cerevisiae* y *Pc. pastoris* puede permitir identificar y caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en el modo de acción de estos péptidos antimicrobianos, lo que reviste una gran importancia para su aplicación industrial y/o de los microorganismos bacteriocinogénicos.

CAPÍTULO VII/CHAPTER VII

Conclusiones

Conclusions

PRIMERA. Las bacteriocinas producidas por *Enterococcus faecium* L50, principalmente la enterocina L50 (L50A y L50B), pueden considerarse bioconservantes potenciales de la cerveza con base en las siguientes características: (i) su amplio espectro de acción antimicrobiana frente a las principales bacterias lácticas alterantes de este producto; (ii) su modo de acción bactericida, dependiente de la dosis de bacteriocina y del sustrato cervecero empleado, en mosto (con y sin lúpulo), cervezas con diferente graduación alcohólica (contenido de etanol del 1–5%, vol/vol) y cerveza sin alcohol (contenido de etanol 0%, vol/vol); (iii) su eficacia para impedir la aparición y el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes; (iv) su estabilidad frente a los tratamientos térmicos empleados generalmente durante el proceso de elaboración de la cerveza para la maceración, ebullición, fermentación y pasteurización; y (v) su estabilidad durante el almacenamiento prolongado en cerveza (contenido de etanol del 5%).

SEGUNDA. La clonación de la región del gen de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica el péptido señal de la feromona factor α 1 (*MF α I_s*) en el vector de expresión de *Sc. cerevisiae* denominado pYES2 permitió la obtención del vector de secreción de proteínas pYABD01, que se encuentra en un elevado número de copias y que es estable segregacionalmente en ausencia de presión selectiva.

TERCERA. La clonación de los genes estructurales de EntL50A (*entL50A*) y EntL50B (*entL50B*) fusionados a *MF α I_s* en el vector recombinante pYABD01 permitió el procesamiento y la secreción heterólogos de EntL50A y EntL50B biológicamente activas por *Sc. cerevisiae* dirigidas por el péptido señal de la feromona factor α 1.

CUARTA. La clonación de *entL50A* y/o *entL50B* fusionados a *MF α I_s* en el vector de secreción de *Pichia pastoris* denominado pPICZ α A y la integración posterior de los vectores recombinantes en el genoma de las levaduras permitieron el procesamiento y la secreción heterólogos de EntL50A y EntL50B biológicamente activas, independiente y conjuntamente, por *Pc. pastoris* dirigidas por el péptido señal de la feromona factor α 1.

QUINTA. Este trabajo describe por primera vez la obtención y funcionalidad de levaduras recombinantes bacteriocinogénicas con la capacidad de expresar y secretar heterológamente una bacteriocina que no pertenece a la familia de la pediocina.

FIRST. The bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* L50, mainly enterocin L50 (L50A and L50B), may be considered as potential beer-biopreservatives based upon the following characteristics: (i) their broad antimicrobial spectrum against the most relevant beer-spoilage lactic acid bacteria; (ii) their dose- and substrate-dependent bactericidal mode of action in wort (hopped and unhopped), and alcoholic (1–5% ethanol, vol/vol) and non-alcoholic (0% ethanol, vol/vol) lager beers; (iii) their effectiveness to avoid the development of bacterial resistances; (iv) their ability to withstand the heat treatments used during the brewing process for mashing, boiling, fermentation and pasteurization; (v) and their long-term stability in lager beer (5% ethanol, vol/vol).

SECOND. Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene region encoding the mating pheromone α -factor 1 secretion signal (*MF α _s*) into the *Sc. cerevisiae* expression vector pYES2 resulted in the high-copy number and segregationally stable protein secretion vector pYABD01.

THIRD. Cloning of the structural genes of EntL50A (*entL50A*) and EntL50B (*entL50B*) fused to *MF α _s* into the recombinant vector pYABD01 allowed the heterologous processing and secretion of biologically active EntL50A and EntL50B by *Sc. cerevisiae* directed by the mating pheromone α -factor 1 secretion signal.

FOURTH. Cloning of *entL50A* and/or *entL50B* fused to *MF α _s* into the *Pichia pastoris* secretion vector pPICZ α A and further integration of the recombinant vectors into the yeast genome permitted the heterologous processing and secretion of biologically active EntL50A and EntL50B, separately and together, by *Pc. pastoris* directed by the mating pheromone α -factor 1 secretion signal.

FIFTH. The present work reports for the first time the development of recombinant bacteriocinogenic yeasts heterologously expressing and secreting a non pediocin-like bacteriocin.

CAPÍTULO VIII

Bibliografía

- Aasen, I. M., T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson e I. Storrø.** 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 159–166.
- Aasen, I. M., S. Markussen, T. Møretrø, T. Katla, L. Axelsson y K. Naterstad.** 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *Int. J. Food Microbiol.* 87: 35–43.
- Abee, T.** 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 1–9.
- Abee, T., L. Krockel y C. Hill.** 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28: 169–185.
- Abriouel, H., R. Lucas, N. Ben Omar, E. Valdivia, M. Maqueda, M. Martínez-Canamero y A. Gálvez.** 2005. Enterocin AS-48RJ: a variant of enterocin AS-48 chromosomally encoded by *Enterococcus faecium* RJ16 isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 383–397.
- Abriouel, H., N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006. Bacteriocin production, plasmid content and plasmid location of enterocin P structural gene in enterococci isolated from food sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 28: 1–7.
- ACNFP.** 1996. Report on *Enterococcus faecium*, strain K77D. MAFF Advisory Committee on Novel Foods and processes. Londres, Reino Unido.
- Achemchem, F., M. Martínez-Bueno, J. Abrini, E. Valdivia y M. Maqueda.** 2005. *Enterococcus faecium* F58, a bacteriocinogenic strain naturally occurring in Jben, a soft, farmhouse goat's cheese made in Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 99: 141–150.
- Achemchem, F., J. Abrini, M. Martínez-Bueno, E. Valdivia y M. Maqueda.** 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in goat's milk and goat's jben by the bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* F58 strain. *J. Food. Prot.* 69: 2370–2376.
- Adams, M. R.** 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 68: 171–178.
- Adams, M. R. y P. Marteau.** 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int. J. Food Microbiol.* 27: 263–264.
- Adams, M. R. y L. Nicolaides.** 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control* 8: 227–239.
- Aguirre, M. y M. D. Collins.** 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95–107.
- Al-Holy, M., H. Al-Qadiri, M. Lin y B. Rasco.** 2006. Inhibition of *Listeria innocua* in hummus by a combination of nisin and citric acid. *J. Food Prot.* 69: 1322–1327.
- Allende, A., B. Martínez, V. Selma, M. I. Gil, J. E. Suárez y A. Rodríguez.** 2007. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiol.* 24: 759–766.
- Allison, G. E. y T. R. Klaenhammer.** 1996. Functional analysis of the gene encoding immunity to lactacin F, *lafI*, and its use as a *Lactobacillus*-specific, food-grade genetic marker. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4450–4460.
- Allison, G. E., C. Fremaux y T. R. Klaenhammer.** 1994. Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. *J. Bacteriol.* 176: 2235–2241.
- Allison, G. E., R. W. Worobo, M. E. Stiles y T. R. Klaenhammer.** 1995a. Heterologous expression of the lactacin F peptides by *Carnobacterium piscicola* LV17. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1371–1377.
- Allison, G. E., C. Ahnn, M. E. Stiles y T. R. Klaenhammer.** 1995b. Utilization of the leucocin A export system in *Leuconostoc gelidum* for production of a *Lactobacillus* bacteriocin. *FEMS Microbiol. Lett.* 131: 87–93.
- Alvarado, C., B. E. García-Almendárez, S. E. Martín y C. Regalado.** 2005. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. *Curr. Microbiol.* 51: 110–115.

- Ananou, S., M. Garriga, M. Hugas, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez y E. Valdivia. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 179–190.
- Ananou, S., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, A. Gálvez y E. Valdivia. 2007. Bactericidal synergism through enterocin AS-48 and chemical preservatives against *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 45: 19–23.
- Anderssen, E. L., D. B. Diep, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer. 1998. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2269–2272.
- Andrighetto, C., E. Knijff, A. Lombardi, S. Torriani, M. Vancanneyt, K. Kersters, J. Swings y F. Dellaglio. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.* 68: 303–316.
- Anónimo. 1981. The European Brewing Convention. Analytica Microbiologica: Part II. *J. Inst. Brew.* 87: 303–321.
- Anónimo. 1997. Methods of Analysis, vol. 2 - Microbiological. Inst. Brew. Londres, Reino Unido.
- Anónimo. 2001. Brochure on the use of enterococci in cheese manufacture. Research project “Enterococci in food fermentations: Functional and safety aspects” (FAIR Project CT97–3078).
- Anónimo. 2002. Brochure on safety and health promotion aspects of enterococci. Research project “Enterococci in food fermentations: Functional and safety aspects” (FAIR Project CT97–3078).
- Anónimo. 2003. Cerveceros de España: Informe económico 2003. Obtenido el 14 de diciembre de 2006 desde <http://www.cerveceros.org/cm/resource/doc/dossiercerveceros.pdf>.
- Anónimo. 2006a. Anuario y avances de superficies y producciones. Secretaría General Técnica-MAPA.
- Anónimo. 2006b. Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios (GSFA, Codex STAN 192–1995).
- Anónimo. 2006c. Obtenido en noviembre de 2006 desde http://www.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/cebada.htm
- Anónimo. 2006d. Aguas y bebidas. Obtenido en diciembre de 2006 desde <http://usuarios.lycos.es/vicobos/nutricion/bebidas.htm>
- Aranha, C., S. Gupta y K. V. Reddy. 2004. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide nisin: in vitro and in vivo studies. *Contraception* 69: 333–338.
- Arques, J. L., E. Rodríguez, P. Gaya, M. Medina, B. Guamis y M. Núñez. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98: 254–260.
- Audisio, M. C., H. R. Terxolo y M. C. Apella. 2005. Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3373–3375.
- Axelsson, L. y A. Holck. 1995. The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J. Bacteriol.* 177: 2125–2137.
- Axelsson, L., T. Katla, M. Bjørnslett, V. G. H. Eijsink y A. Holck. 1998. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 137–143.
- Aymerich, M. T. y M. Hugas. 1998. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne* 72: 39–50.
- Aymerich, T., H. Holo, L. S. Håvarstein, M. Hugas, M. Garriga e I. F. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1676–1682.
- Aymerich, M. T., M. Garriga, J. M. Monfort, I. F. Nes y M. Hugas. 2000a. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiol.* 17: 33–45.
- Aymerich, M. T., M. G. Artigas, M. Garriga, J. M. Monfort y M. Hugas. 2000b. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 88: 686–694.

- Aymerich, M. T. M. Garriga, J. Ylla, J. Vallier, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2000c. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63: 721–726.
- Aymerich, M. T., M. Garriga, S. Costa, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2002. Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. *Int. Dairy J.* 12: 239–246.
- Baccus-Taylor, G., K. A. Glass, J. B. Luchansky y A. J. Maurer.** 1993. Fate of *Listeria monocytogenes* and pediococcal starter cultures during the manufacture of chicken summer sausage. *Poult. Sci.* 72: 1772–1778.
- Back, W.** 1994. Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt Int.* 4: 326–328.
- Back, W., S. Breu y C. Weigand.** 1988. Infektionsursachen im Jahre 1987. *Brauwelt Int.* 178: 1358–1362.
- Balla, E., L. M. T. Dicks, M. du Toit, M. J. van der Merwe y W. H. Holzapfel.** 2000. Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by *Enterococcus faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1298–1304.
- Bamforth, C. W.** 2003. Beer: Tap into the art and science of brewing. Oxford University Press, Inc., Reino Unido.
- Bardazzi, I. y E. Casalone.** 2004. Construction of two vectors for transformation of laboratory, natural and industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains to trifluoroleucine and G418 resistance. *Folia Microbiol.* 49: 534–538.
- Bari, M. L., D. O. Ukuku, T. Kawasaki, Y. Inatsu, K. Isshiki y S. Kawamoto.** 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *J. Food Prot.* 68: 1381–1387.
- Bartowsky, E. J., D. Xia, R. L. Gibson, G. H. Fleet y P. A. Henschke.** 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 307–314.
- Basanta, A., J. Sánchez, B. Gómez-Sala, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2008a. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* L50, a strain producing enterocins L50 (L50A and L50B), P and Q, against beer spoilage lactic acid bacteria in broth, wort (hopped and unhopped), and alcoholic and non-alcoholic lager beers. *Int. J. Food. Microbiol.* (manuscrito aceptado para su publicación, Ref. N° FOOD-D-07-00582).
- Basanta, A., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2008b. Development of bacteriocinogenic strains of *Saccharomyces cerevisiae* heterologously expressing and secreting enterocins L50A and L50B, the two leader-less peptides of enterocin L50 from *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* (manuscrito enviado para su publicación).
- Batdorj, B., M. Dalgalarrodo, Y. Choiset, J. Pedroche, F. Métro, H. Prévost, J.-M. Chobert y T. Haertlé.** 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *J. Appl. Microbiol.* 101: 837–848.
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris y M. Turck.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45: 493–496.
- Bauer, R. y L. M. T. Dicks.** 2005. Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 101: 201–216.
- Beaulieu, L., D. Groleau, C. B. Miguez, J. -F. Jetté, H. Aomari y M. Subirade.** 2005. Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr. Purif.* 43: 111–125.
- Beaulieu, L., H. Aomari, D. Groleau y M. Subirade.** 2006. An improved and simplified method for the large-scale purification of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43: 77–84.
- Becquet, P.** 2003. EU assessment of enterococci as feed additives. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 247–254.
- Bechinger, B.** 1999. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 157–183.
- Behr, J., M. G. Gänzle y R. F. Vogel.** 2006. Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6483–6492.

- Ben Embarek, P. K., V. From Jeppesen y H. H. Hus.** 1994. Antilisterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from sous-vide cooked fish fillets. *Food Microbiol.* 11: 525–536.
- Ben Omar, N., A. Castro, R. Lucas, H. Abriouel, N. M. K. Yousif, C. M. A. P. Franz, W. H. Holzapfel, R. Pérez-Pulido, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *System. Appl. Microbiol.* 27: 118–130.
- Benech, R. -O., E. E. Kheadr, R. Laridi, C. Lacroix e I. Fliss.** 2002a. Inhibition of *Listeria innocua* in Cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3683–3690.
- Benech, R. -O., E. E. Kheadr, C. Lacroix e I. Fliss.** 2002b. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during Cheddar cheese ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5607–5619.
- Benkerroum, N. y W. E. Sandine.** 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* 71: 3237–3245.
- Benkerroum, N., Y. Ghouati, H. Ghalfi, T. Elmejdoub, D. Roblain, P. Jacques y P. Thonart.** 2002. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in a model cultured milk (Iben) by *in situ* bacteriocin production from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. *Int. J. Dairy Technol.* 55: 145–151.
- Benkerroum, N., A. Daoudi, T. Hamraoui, H. Ghalfi, C. Thiry, M. Duroy, P. Evrart, D. Roblain y P. Thonart.** 2005. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98: 56–63.
- Bennik, M. H. J., B. Vanloo, R. Brasseur, L. G. M. Gorris y E. J. Smid.** 1998. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated *Enterococcus mundtii*: full characterization and interaction with target organisms. *Biochim. Biophys. Acta* 1373: 47–58.
- Benyacoub, J., G. L. Czarnecki-Maulden, C. Cavadini, T. Sauthier, R. E. Anderson, E. J. Schiffrin y T. von der Weid.** 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J. Nutr.* 133: 1158–1162.
- Benz, R., G. Jung y H. -G. Sahl.** 1991. Mechanism of channel forming lantibiotics in black lipid membranes. En: “*Nisin and novel lantibiotics*”, pp. 359–372. Jung, G. y H. -G. Sahl (eds.). ESCOM, Scientific Publishers BV, Países Bajos.
- Berjeaud, J.-M. e Y. Cenatiempo.** 2004. Purification of antilisterial bacteriocins. *Methods Mol. Biol.* 268: 225–233.
- Bernbom, N., T. R. Licht, C.-H. Brogren, B. Jelle, A. H. Johansen, I. Badiola, F. K. Vogensen y B. Nørnung.** 2006. Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 239–244.
- Berry, E. D., R. W. Hutkins y R. W. Mandigo.** 1991. The use of bacteriocin producing *Pediococcus acidilactici* to control post-processing *Listeria monocytogenes* contamination of frankfurters. *J. Food Prot.* 54: 681–686.
- Bhatti, M., A. Veeramachaneni y L. A. Shelef.** 2004. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 215–219.
- Bhunia, A. K., M. G. Johnson y B. Ray.** 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Ind. Microbiol.* 2: 319–322.
- Billman-Jacobe, H.** 1996. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotechnol.* 7: 500–504.
- Björkroth, K. J. , R. Geisen, U. Schillinger, N. Weiss, P. de Vos, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala y P. Vandamme.** 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3764–3772.

- Björkroth, J., M. Ristiniemi, P. Vandamme y H. Korkeala.** 2005. *Enterococcus* species dominating in fresh modified-atmosphere-packaged, marinated broiler legs are overgrown by *Carnobacterium* and *Lactobacillus* species during storage at 6°C. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 267–276.
- Blom, H., T. Katla, B. F. Hagen y L. Axelsson.** 1997. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 103–109.
- Boman, H. G.** 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61–92.
- Booth, M. C., C. P. Bogie, H. -G. Sahl, R. J. Siezen, K. L. Hatter y M. S. Gilmore.** 1996. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol. Microbiol.* 21: 1175–1184.
- Borch, E., M. -L. Kant-Muermans e Y. Blixt.** 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 103–120.
- Bouksaim, M., C. Lacroix, R. Bazin y R. E. Simard.** 1999. Production and utilization of polyclonal antibodies against nisin in an ELISA and for immuno-location of nisin in producing and sensitive bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.* 87: 500–510.
- Bouksaim, M., C. Lacroix, P. Audet y R. E. Simard.** 2000. Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 59: 141–156.
- Bouttefroy, A. y J. B. Millière.** 2000. Nisin-curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin resistant cells of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 65–75.
- Bover-Cid, S., M. Izquierdo-Pulido y M. C. Vidal-Carou.** 2001. Biogenic amine formation in ripening sausages formulated with and without sugar. *Meat Sci.* 57: 215–221.
- Bower, C. K., M. K. Bothwell y J. McGuire.** 2001. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. *Colloids Surf. B: Interfaces* 22: 259–265.
- Bower, C. K., J. E. Parker, A. Z. Higgins, M. E. Oest, J. T. Wilson, B. A. Valentin, M. K. Bothwell y J. McGuire.** 2002. Protein antimicrobial barrier to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids Surf. B: Interfaces* 25: 81–90.
- Brake, A. J.** 1989. Secretion of heterologous proteins directed by the yeast α -Factor leader. *Biotechnol.* 13: 269–280.
- Brake, A. J.** 1990. α -Factor leader-directed secretion of heterologous proteins from yeast. *Methods Enzymol.* 185: 408–421.
- Brake, A. J., J. P. Merryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela y P. J. Barr.** 1984. α -Factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4642–4646.
- Breukink, E., I. Weidemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. -G. Sahl y B. de Kruijff.** 1999. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* 286: 2361–2364.
- Brewer, R., M. R. Adams y S. F. Park.** 2002. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 18–21.
- Brey, S. E., S. de Costa, P. J. Rogers, J. H. Bryce, P. C. Morris, W. J. Mitchell y G. G. Stewart.** 2003. The effect of proteinase A on foam-active polypeptides during high and low gravity fermentation. *J. Inst. Brew.* 109: 194–202.
- Brillet, A., M. -F. Pilet, H. Prevost, A. Bouttefroy y F. Leroi.** 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1029–1037.
- Bron, P. A., M. G. Benchimol, J. Lambert, E. Palumbo, M. Deghorain, J. Delcour, W. M. de Vos, M. Kleerebezem y P. Hols.** 2002. Use of the *alr* gene as a food-grade selection marker in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5663–5670.
- Brot, N. y H. Weissbach.** 1991. Biochemistry of methionine sulfoxide residues in proteins. *Biofactors* 3: 91–96.

- Brötz, H., M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Götz, G. Bierbaum y H.-G. Sahl.** 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30: 317–327.
- Brurberg, M. B., I. F. Nes y V. G. H. Eijsink.** 1997. Pheromone-induced production of antimicrobial peptides in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 26: 347–360.
- Bryan, E. M., T. Bae, M. Kleerebezem y G. M. Dunne.** 2000. Improved vectors for nisin-controlled expression in Gram-positive bacteria. *Plasmid* 44: 183–190.
- Buckenhüskes, H. J.** 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 253–272.
- Budde, B. B., T. Hornbæk, T. Jacobsen, V. Barkholt y A. G. Koch.** 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 171–184.
- Bujalance, C., E. Moreno, M. Jiménez-Varela y A. Ruiz-Bravo.** 2007. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 28–34.
- Busani, L., M. del Grosso, C. Paladini, C. Graziani, A. Pantosti, F. Biavasco y A. Caprioli.** 2004. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 17–22.
- Buyong, N., J. Kok y J. B. Luchansky.** 1998. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4842–4845.
- Cai, Y., L. K. Ng. y J. M. Farber.** 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. *J. Appl. Microbiol.* 83: 499–507.
- Callewaert, R., M. Hugas y L. de Vuyst.** 2000. Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 57: 33–42.
- Campbell, I.** 1997. Beer. En: “*Food microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 662–670. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, EE.UU.
- Campos, C. A., O. Rodríguez, P. Calo-Mata, M. Prado, J. Barros-Velázquez.** 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39: 356–364.
- Cao, T. B. y M. H. Jr. Saier.** 2003. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1609: 115–125.
- Caplice, E. y G. F. Fitzgerald.** 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131–149.
- Carolissen-Mackay, V., G. Arendse y J. W. Hastings.** 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 1–16.
- Carr, F. J., D. Chill y N. Maida.** 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281–370.
- Carresi, L., B. Pantera, C. Zoppi, G. Cappugi, A. L. Oliveira, T. A. Pertinhez, A. Spisni, A. Scala y L. Pazzagli.** 2006. Cerato-platanin, a phytotoxic protein from *Ceratocystis fimbriata*: expression in *Pichia pastoris*, purification and characterization. *Protein Expr. Purif.* 49: 159–167.
- Casaus, P.** 1998. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium* T136. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Casaus, M. P., T. Nilsen, L. M. Cintas, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143: 2287–2294.

- Castañé, F. X.** 2000. Los tanques cilindro-cónicos y el tiempo de guarda de la cerveza. *Alim. Equip. Tecnol.* mayo: 75–84.
- Castro, A., N. Ben Omar, R. Lucas, H. Abriouel, M. T. García, M. Martínez-Cañamero, R. Pérez-Pulido, M. J. Grande y A. Gálvez.** 2004. “El género *Enterococcus* en microbiología de los alimentos”. Universidad de Jaén, España.
- Cebollero, E., D. González-Ramos, L. Tabera y R. González.** 2007. Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine?. *Biotechnol. Lett.* 29: 191–200.
- Cereghino, G. P. L. y J. M. Cregg.** 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 422–427.
- Cereghino, G. P. L., A. J. Sunga, J. L. Cereghino y J. M. Cregg.** 2001. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. En: “*Genetic engineering: principles and methods, vol. 23*”, pp. 157–169. Setlow, J. K. (ed.). Kluwer Academic/Plenum Publisher, Nueva York, EE.UU.
- Cereghino, G. P. L., J. L. Cereghino, C. Ilgen y J. M. Cregg.** 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329–332.
- Cereghino, J. L. y J. M. Cregg.** 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 45–66.
- Cetinkaya, Y., P. Falk y C. G. Mayhall.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686–707.
- Cintas, L. M.** 1995. Caracterización bioquímica y genética de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Cintas, L. M. y P. Casaus.** 1998. La necesidad de conservar los alimentos. Bioconservación. *Alim. Equip. Tecnol.* diciembre: 89–95.
- Cintas, L. M., J. M. Rodríguez, M. F. Fernández, K. Sletten, I. F. Nes, P. E. Hernández y H. Holo.** 1995. Isolation and characterization of pediocin L50, a new bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* with a broad inhibitory spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2643–2648.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. S. Havårstein, P. E. Hernández e I. F. Nes.** 1997. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel *sec*-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4321–4330.
- Cintas, L. M., P. Casaus, H. Holo, P. E. Hernández, I. F. Nes y L. S. Håvarstein.** 1998a. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180: 1988–1994.
- Cintas, L. M., P. Casaus, M. F. Fernández y P. E. Hernández.** 1998b. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiol.* 15: 289–298.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000a. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I). Ácidos orgánicos, metabolitos del oxígeno y productos finales del catabolismo. *Alim. Equip. Tecnol.* julio-agosto: 83–90.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000b. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (II). Bacteriocinas. *Alim. Equip. Tecnol.* septiembre: 109–119.
- Cintas, L. M., P. Casaus y P. E. Hernández.** 2000c. Bacterias lácticas de origen alimentario. Consideraciones taxonómicas y filogenéticas. *Alimentaria* 318: 61–70.
- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, L. S. Håvarstein, H. Holo, P. E. Hernández e I. F. Nes.** 2000d. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. *J. Bacteriol.* 182: 6806–6814.

- Cintas, L. M., P. Casaus, C. Herranz, I. F. Nes y P. E. Hernández.** 2001. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci. Tech. Int.* 7: 281–305.
- Citti, R.** 2005. Aislamiento e identificación de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de leches y quesos de búfala de Venezuela: actividad antimicrobiana y caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Claesson, M. J., D. van Sinderen y P. W. O'Toole.** 2007. The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* 269: 22–28.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes y M. L. Chikindas.** 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1–20.
- Cleveland-McEntire, J., G. M. Carman y T. J. Montville.** 2004. Increased ATPase activity is responsible for acid sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* ATCC 700302. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2717–2721.
- Clewell, D. B.** 1993a. Sex pheromones and the plasmid-encoded mating response in *Enterococcus faecalis*. En: “*Bacterial Conjugation*”, pp. 349–367. Clewell, D. B. (ed.). Plenum Press, Nueva York, EE.UU.
- Clewell, D. B.** 1993b. Bacterial sex pheromone-induce plasmid transfer. *Cell* 73: 9–12.
- Coburn, P. S. y M. S. Gilmore.** 2003. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell. Microbiol.* 5: 661–669.
- Cocconcelli, P. S., D. Cattivelli y S. Gazzola.** 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 315–323.
- Cocolin, L., R. Foschino, G. Comi y M. G. Fortina.** 2007. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol.* 24: 752–758.
- Coffey, A., M. Ryan, R. P. Ross, C. Hill, E. Arendt y G. Schwarz.** 1998. Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 231–235.
- Coghe, S., B. Gheeraert, A. Michiels y F. R. Delvaux.** 2006. Development of maillard reaction related characteristics during malt roasting. *J. Inst. Brew.* 112: 148–156.
- Cole, K., M. B. Farnell, A. M. Donoghue, N. J. Stern, E. A. Svetoch, B. N. Eruslanov, L. I. Volodina, Y. N. Kovalev, V. V. Pereygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, V. D. Pokhilenko, V. N. Borzenkov, O. E. Svetoch, T. Y. Kudryavtseva, I. Reyes-Herrera, P. J. Blore, F. Solis de los Santos y D. J. Donoghue.** 2006. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poult. Sci.* 85: 1570–1575.
- Comi, G., R. Urso, L. Iacumin, K. Rantsiou, P. Cattaneo, C. Cantoni y L. Cocolin.** 2005. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Sci.* 69: 381–392.
- Connil, N., L. Plissoneau, B. Onno, M. F. Pilet, H. Prevost y X. Dousset.** 2002. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels, and glucose concentrations. *J. Food Prot.* 65: 333–338.
- Cookson, A. L., S. J. Noel, W. J. Kelly y G. T. Attwood.** 2004. The use of PCR for the identification and characterisation of bacteriocin genes from bacterial strains isolated from rumen or caecal contents of cattle and sheep. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48: 199–207.
- Cortés, C., R. de la Fuente, A. Contreras, A. Sánchez, J. C. Corrales, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria y J. A. Orden.** 2006. Occurrence and preliminary study of antimicrobial resistance of enterococci isolated from dairy goats in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 100–103.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005a. Bacterial lantibiotics: strategies to improve therapeutic potential. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 61–75.
- Cotter, P. D., C. Hill y R. P. Ross.** 2005b. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 777–788.

- Coventry, M. J., J. B. Gordon, M. Alexander, M. W. Hickey y J. Wan. 1996. A food-grade process for isolation and partial purification of bacteriocins of lactic acid bacteria that uses diatomite calcium silicate. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1764–1769.
- Cox, C. R., P. S. Coburn y M. S. Gilmore. 2005. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 77–84.
- Crandall, A. D. y T. J. Montville. 1998. Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 231–237.
- Cregg, J. M., T. S. Vedvick y W. C. Raschke. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnol.* 11: 905–910.
- Cregg, J. M., J. L. Cereghino, J. Shi y D. R. Higgins. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16: 23–52.
- Criado, R. 2006. Caracterización inmunoquímica y genética de la producción de las enterocinas L50, P y Q por *Enterococcus faecium* L50. Secuencia nucleotídica y análisis funcional de los plásmidos pCIZ1 y pCIZ2. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Criado R., D. B. Diep, Á. Aakra, J. Gutiérrez, I. F. Nes, P. E. Hernández y L. M. Cintas. 2006a. Complete sequence of the enterocin Q-encoding plasmid pCIZ2 from the multiple bacteriocin producer *Enterococcus faecium* L50 and genetic characterization of enterocin Q production and immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6653–6666.
- Criado, R., J. Gutiérrez, M. Martín, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas. 2006b. Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7634–7643.
- Crispie, F., D. Twomey, J. Flynn, C. Hill, P. Ross y W. Meaney. 2005. The lantibiotic lacticin 3147 produced in a milk-based medium improves the efficacy of a bismuth-based teat seal in cattle deliberately infected with *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.* 72: 159–167.
- Crow, V. L., F. G. Martley, T. Coolbear y S. J. Roundhill. 1995. The influence of phage-assisted lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML8 on Cheddar cheese ripening. *Int. Dairy J.* 5: 451–472.
- Cutter, C. N. y G. R. Siragusa. 1998. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 19–23.
- Cha, D. S., J. Chen, H. J. Park y M. S. Chinnan. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in tofu by use of a polyethylene film coated with a cellulosic solution containing nisin. *Int. J. Food Sci. Tech.* 38: 499–503.
- Chandler, J. R. y G. M. Dunny. 2004. Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity. *Peptides* 25: 1377–1388.
- Chapot-Chartier, M. P., C. Deniel, M. Rousseau, L. Vassel y J. C. Gripon. 1994. Autolysis of two strains of *Lactococcus lactis* during cheese ripening. *Int. Dairy. J.* 4: 251–269.
- Chatterjee, C., M. Paul, L. Xie y W. A. van der Donk. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* 105: 633–684.
- Cheigh, C. I e Y. R. Pyun. 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.* 27: 1641–1648.
- Chemler, J. A., Y. Yan y M. A. G. Koffas. 2006. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 5: 20–28.
- Chen, H. y D. G. Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2: 82–100.
- Chen, Y., R. Shapira, M. Eisentein y T. J. Montville. 1997a. Functional characterization of pediocin PA-1 binding to liposomes in the absence of a protein receptor and its relationship to a predicted tertiary structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 524–531.

- Chen, Y., R. D. Ludescher y T. J. Montville.** 1997b. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4770–4777.
- Chen, Y., R. D. Ludescher y T. J. Montville.** 1998. Influence of lipid composition on pediocin PA-1 binding to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3530–3532.
- Chihib, N. -E., L. Monnerat, J. M. Membré y J. -L. Thozolan.** 1999. Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anerobic beer-spoilage bacterium. *J. Appl. Microbiol.* 87: 438–446.
- Chikindas, M. L. y T. J. Montville.** 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. En: “*Control of foodborne microorganisms*”, pp. 303–321. Junerja, V. K. y J. N. Sofos (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Chikindas, M. L., K. Venema, A. M. Ledeboer, G. Venema y J. Kok.** 1995. Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 183–189.
- Choi, J. H. y S. Y. Lee.** 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 625–635.
- Christ, K., I. Wiedemann, U. Bakowsky, H. -G. Sahl y G. Bendas.** 2007. The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 694–704.
- Christie, P. J.** 2001. Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Mol. Microbiol.* 40: 294–305.
- Chung, K. T., J. S. Dickson y J. D. Crouse.** 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1329–1333.
- Daeschel, M. A.** 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43: 164–167.
- Daeschel, M. A.** 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. En: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 63–91. Hoover, D. G. y L. R. Steenson (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Daeschel, M. A. y H. P. Fleming.** 1984. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiol.* 1: 303–313.
- Daeschel, M. A., D. -S. Jung y B. T. Watson.** 1991. Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 601–603.
- Dalet, K., C. Briand, Y. Cenatiempo e Y. Héchard.** 2000. The *rpoN* gene of *Enterococcus faecalis* directs sensitivity to subclass IIa bacteriocins. *Curr. Microbiol.* 41: 441–443.
- Dalet, K., Y. Cenatiempo, P. Cossart e Y. Héchard.** 2001. A σ^{54} -dependent PTS permease of the mannose family is responsible for sensitivity of *Listeria monocytogenes* to mesentericin Y105. *Microbiology* 147: 3263–3269.
- Daoudi, L., C. Turcotte, C. Lacroix e I. Fliss.** 2001. Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 114–119.
- Dassa, E.** 2000. ABC transport. En: “*Encyclopedia of Microbiology, vol. I*”, pp. 1–12. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Dassa, E. y P. Bouige.** 2001. The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152: 211–229.
- Davies, E. A. y J. Delves-Broughton.** 2000. Nisin. En: “*Encyclopedia of food microbiology*”, pp. 183–191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.

- Davies, E. A., C. F. Milne, H. E. Bevis, R. W. Potter, J. M. Harris, G. C. Williams, L. V. Thomas y J. Delves-Broughton.** 1999. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. *J. Food Prot.* 62: 1004–1010.
- Daw, M. A. y F. R. Falkiner.** 1996. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron.* 27: 467–479.
- De Castro, A., A. Montaña, F. -J. Casado, A. -H. Sánchez y L. Rejano.** 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiol.* 19: 637–644.
- De Jong, A., S. A. F. T. van Hijum, J. J. E. Bijlsma, J. Kok y O. P. Kuipers.** 2006. BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res.* 34: 273–279.
- De Kwaadsteniet, M., S. D. Todorov, H. Knoetze y L. M. T. Dicks.** 2005. Characterization of a 3.944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 433–444.
- De Kwaadsteniet, M., T. Fraser, C. A. van Reenen y L. M. T. Dicks.** 2006. Bacteriocin T8, a novel class IIa *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4761–4766.
- De Ruyter, P. G., O. P. Kuipers y W. M. de Vos.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3662–3667.
- De Vos, W. M.** 1999a. Safe and sustainable systems for food-grade fermentations by genetically modified lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 9: 3–10.
- De Vos, W. M.** 1999b. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 289–295.
- De Vuyst, L. y E. J. Vandamme.** 1994a. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance. En: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 1–8. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Oxford, Reino Unido.
- De Vuyst, L. y E. J. Vandamme.** 1994b. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 9–129. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Oxford, Reino Unido.
- De Vuyst, L. y F. Leroy.** 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194–199.
- De Vuyst, L., R. Callewaert y K. Crabbè.** 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology* 142: 817–827.
- De Vuyst, L., M. R. Foulquié-Moreno y H. Revets.** 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 299–318.
- Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill y P. Ross.** 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16: 1058–1071.
- Degnan, A. J., C. W. Kaspar, W. S. Otwell, M. L. Tamplin y J. B. Luchansky.** 1994. Evaluation of lactic acid bacterium fermentation products and food-grade chemicals to control *Listeria monocytogenes* in blue crab (*Callinectes sapidus*) meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3198–3203.
- Del Campo, R., C. Tenorio, R. Jiménez-Díaz, C. Rubio, R. Gómez-Lus, F. Baquero y C. Torres.** 2001. Bacteriocin production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 905–912.
- Delgado, S., T. Delgado y B. Mayo.** 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *J. Food Prot.* 65: 1590–1596.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans y J. Hugenholtz.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 193–202.
- Delves-Broughton, J., P.** 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia* 57: 525–527.

- Dequin, S.** 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 577–588.
- Destoumieux-Garzón, D., J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2002. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie* 84: 511–519.
- Desvaux, M., N. J. Parham e I. R. Henderson.** 2004. The autotransporter secretion system. *Res. Microbiol.* 155: 53–60.
- Devlieghere, F., L. Vermeiren y J. Debevere.** 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14: 273–285.
- Devriese, L. A. y B. Pot.** 1995. The genus *Enterococcus*. En: “*The Genera of Lactic Acid Bacteria, vol. 2*”, pp. 327–367. Wood, B. J. B. y W. H. Holzapel (eds.). Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido.
- Devriese, L. A., J. Hommez, R. Wijfels y F. Haesebrouck.** 1991. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 46–50.
- Devriese, L. A., M. D. Collins y R. Wirth.** 1992. The genus *Enterococcus*. En: “*The Prokaryotes. A Hand Book on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications, vol. 2*”, pp. 11465–11481. Balows, A., H. G. Truper, M. Dwordin, W. Harder y K. H. Schleifer (eds.). Nueva York, EE.UU.
- Devriese, L. A., M. Baele y P. Butaye.** 2005. The genus *Enterococcus*. En: “*The prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiological community*”. Extraído en octubre de 2005 desde <http://141.150.117:8080/prokPUB/index.htm>.
- Díaz, M., E. Valdivia, M. Martínez-Bueno, M. Fernández, A. Santos, H. Ramírez-Rodrigo y M. Maqueda.** 2003. Characterization of a new operon, *as-48EFGH*, from the *as-48* gene cluster involved in immunity to enterocin AS-48. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1229–1236.
- Dickely, F., D. Nilsson, E. B. Hansen y E. Johansen.** 1995. Isolation of *Lactococcus lactis* nonsense suppressors and construction of a food-grade cloning vector. *Mol. Microbiol.* 15: 839–847.
- Dicks, L. M. T., F. D. Mellett y L. C. Hoffman.** 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Sci.* 66: 703–708.
- Diep, D. B. e I. F. Nes.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107–122.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein e I. F. Nes.** 1995. A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* 18: 631–639.
- Diep, D. B., L. S. Håvarstein e I. F. Nes.** 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J. Bacteriol.* 178: 4472–4483.
- Diep, D. B., L. Axelsson, C. Grefslí e I. F. Nes.** 2000. The synthesis of the bacteriocin sakacin A is a temperature-sensitive process regulated by a pheromone peptide through a three-component regulatory system. *Microbiology* 146: 2155–2160.
- Diep, D. B., M. Skaugen, Z. Salehian, H. Holo e I. F. Nes.** 2007. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 2384–2389.
- Dieye, Y., A. J. W. Hoekman, F. Clier, V. Juillard, H. J. Boot y J.-C. Piard.** 2003. Ability of *Lactococcus lactis* to export viral capsid antigens: a crucial step for development of live vaccines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7281–7288.
- Diez-Gonzalez, F.** 2007. Applications of bacteriocins in livestock. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8: 15–24.
- DiMichele, L. J. y M. J. Lewis.** 1993. Rapid, species-specific detection of lactic acid bacteria from beer using the polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 51: 63–66.
- Dimov, S. G.** 2007. A novel bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* 3587. *Curr. Microbiol.* 55: 323–327.

- Doi, K., T. Eguchi, S.-H. Choi, A. Iwatake, S. Ohmomo y S. Ogata.** 2002. Isolation of enterocin SE-K4-encoding plasmid and a high enterocin SE-K4 producing strain of *Enterococcus faecalis* K-4. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 434–436.
- Domig, K. J., H. K. Mayer y W. Kneifel.** 2003a. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 147–164.
- Domig, K. J., H. K. Mayer y W. Kneifel.** 2003b. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 165–188.
- Donohue, D. C., S. Salminen y P. Marteau.** 1995. Safety of probiotic bacteria. En: “*Lactic Acid Bacteria. Microbiology and functional aspects*”, pp. 369–383, 2ª ed. Salminen, S. y A. Von Wright (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Dos Santos-Nascimento, J., P. Carlin, M. A. Vasconcelos, K. R. Netto y M. C. F. Bastos.** 2005. Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 106: 61–71.
- Dos Santos-Nascimento, J. S., H. Ceotto, S. B. Nascimento, M. Giambiagi-deMarval, K. R. N. Santos y M. C. F. Bastos.** 2006. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 215–221.
- Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cuot, A. Andremont y P. Courvalin.** 1991. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 3: 502–504.
- Douglas, P., F. J. Meneses y V. Jiranek.** 2006. Filtration, haze and foam characteristics of fermented wort mediated by yeast strain. *J. Appl. Microbiol.* 100: 58–64.
- Drider, D., G. Fimland, Y. Héchard, L. M. McMullen y H. Prévost.** 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 564–582.
- Driessen, A. J. M. y C. van der Does.** 2002. Protein export in bacteria. En: “*Protein Targeting, Transport and Translocation*”, pp. 47–73. Dalbey, R. E. y G. von Heijne (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Driessen, A. J. M., H. W. van de Hooven, W. Kuiper, M. van de Kamp, H.-G. Sahl, R. N. H. Konings y W. N. Konings.** 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry* 34: 1606–1614.
- Driessen, A. J. M., P. Fekkes y J. P. W. van der Wolk.** 1998. The *sec* system. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 216–222.
- Driessen, A. J. M., C. van der Does y N. Nouwen.** 2002. Bacterial protein secretion and targeting. En: “*Biopolymers, vol. 7*”, pp. 227–259. Fahnstock, S. y A. Steinbüchel (eds.). Wiley-VCH, Nueva York, EE.UU.
- Drosinos, E. H., M. Mataragas, N. Xiraphi, G. Moshonas, F. Gaitis y J. Metaxopoulos.** 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Sci.* 69: 307–317.
- DSMZ.** 2005. Bacterial nomenclature up-to-date. Approved list, validation lists. Extraído en octubre de 2005 desde http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14.
- Du Toit, M. e I. S. Pretorius.** 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature’s own arsenal: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21: 74–96.
- Du Toit, M., C. M. A. P. Franz, L. M. T. Dicks y W. H. Holzapfel.** 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J. Appl. Microbiol.* 88: 482–494.
- Duffes, F., F. Leroy, P. Boyaval y X. Dousset.** 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 47: 33–42.
- Duffes, F., C. Corre, F. Leroy, X. Dousset y P. Boyaval.** 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semi-purified bacteriocins of *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. *J. Food Prot.* 62: 1394–1403.

- Duffes, F., P. Jenoe y P. Boyaval.** 2000. Use of two-dimensional electrophoresis to study differential protein expression in divercin V41-resistant and wild-type strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4318–4324.
- Dufour, A., T. Hindré, D. Haras y J. P. Le Pennec.** 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 134–167.
- Duport, C., C. Baysse e Y. Michel-Briand.** 1995. Molecular characterization of pyocin S3, a novel S-type pyocin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 270: 8920–8927.
- Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzón, J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2007a. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* 24: 708–734.
- Duquesne, S., V. Petit, J. Peduzzi y S. Rebuffat.** 2007b. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 200–209.
- Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax.** 2002. “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Dykes, G. A. y J. W. Hastings.** 1998. Fitness costs associated with class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* B73. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 5–8.
- Eaton, T. J. y M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1628–1635.
- Eguchi, T., K. Kaminaka, J. Shima, S. Kawamoto, K. Mori, S. H. Choi, K. Doi, S. Ohmomo y S. Ogata.** 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. *Biosci. Biohecnol. Biochem.* 65: 247–253.
- Eichenbaum, Z., M. J. Federle, D. Marra, W. M. de Vos, O. P. Kuipers, M. Kleerebezem y J. R. Scott.** 1998. Use of the lactococcal *nisA* promoter to regulate gene expression in gram-positive bacteria: comparison of induction level and promoter strength. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2763–2769.
- Eijsink, V. G. H., M. B. Brurberg, P. H. Middelhoven e I. F. Nes.** 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.* 178: 2232–2237.
- Eijsink, V. G. H., M. Skeie, P. H. Middelhoven, M. B. Brurberg e I. F. Nes.** 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275–3281.
- Eijsink, V. G. H., L. Axelsson, D. B. Diep, L. S. Håvarstein, H. Holo e I. F. Nes.** 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 639–654.
- Einarsson, H. y H. L. Lauzon.** 1995. Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 669–676.
- Ennahar, S. y N. Deschamps.** 2000. Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 88: 449–457.
- Ennahar, S., O. Assobhel y C. Hasselmann.** 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a smear-surface soft cheese by *Lactobacillus plantarum* WHE 92, a pediocin AcH producer. *J. Food Prot.* 61: 186–191.
- Ennahar, S., K. Sonomoto y A. Ishizaki.** 1999. Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 705–716.
- Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto y A. Ishizaki.** 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 85–106.
- Ennahar, S., Y. Asou, T. Zendo, K. Sonomoto y A. Ishizaki.** 2001. Biochemical and genetic evidence for production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* WHE81. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 291–301.
- Epand, R. M. y H. J. Vogel.** 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 11–28.

- Eppert, I., N. Valdés-Stauber, H. Götz, M. Busse y S. Scherer.** 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium lines* as evaluated in situ on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4812–4817.
- Estrany, F., R. Oliver y N. Borrás.** 2006. Aspectos tecnológicos de la producción industrial de cerveza. *Alim. Equip. Tecnol.* mayo: 33–41.
- Estrany, F., D. Aradilla y R. Oliver.** 2007. El sector cervecero continúa creciendo e innovando, con el lanzamiento de nuevos envases y variedades. *Alimentaria* 384: 57–60.
- Facklam, R.** 2005. Minimum criteria for establishing new *Enterococcus* species. *2nd International ASM-FEMS Conference on Enterococci*. Comunicaciones, S1:1. Helsingør, Dinamarca.
- Facklam, R. y D. F. Sahm.** 1995. *Enterococcus*. En: “*Manual of clinical microbiology*”, pp. 308–314, 6^a ed. Murria, P. R., E. J. Baron, M. A. Paller, F. C. Tenover y R. H. Yolken (eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C., EE.UU.
- Falagas, M. E., G. I. Betsi y S. Athanasiou.** 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 657–664.
- Falahee, M. B., J. W. Dale, M. R. Adams y B. A. Morris.** 1990. Enzyme immunoassay for nisin. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 25: 590–595.
- Farías, M. E., M. Nuñez de Kairuz, F. Sesma, J. Palacios, A. P. de Ruiz Holgado y G. Oliver.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin enterocin CRL35 during goat cheese making. *Milchwissenschaft* 54: 30–32.
- Fath, M. J. y R. Kolter.** 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57: 995–1017.
- Fekkes, P. y A. J. M. Driessen.** 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrana. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 161–173.
- Fenelon, M. A., M. P. Ryan, M. C. Rea, T. P. Guinee, R. P. Ross, C. Hill y D. Harrington.** 1999. Elevated temperature ripening of reduced fat Cheddar made with or without lactacin 3147-producing starter culture. *J. Dairy Sci.* 82: 10–22.
- Fernández, A., C. Reviriego, M. L. Marín, L. Fernández, N. Horn y J. M. Rodríguez.** 2005a. Producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas. 1. Expresión de genes nativos. *Alimentaria* 360: 55–59.
- Fernández, A., C. Reviriego, M. L. Marín, L. Fernández, N. Horn y J. M. Rodríguez.** 2005b. Producción heteróloga de bacteriocinas de bacterias lácticas. 2. Intercambio de líderes y/o de sistemas de secreción. *Alimentaria* 360: 61–67.
- Fernandez, J. L. y W. J. Simpson.** 1995. Measurement and prediction of the susceptibility of lager beer to spoilage by lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 419–425.
- Fernández, L., E. Jiménez, R. Martín, E. Rodríguez, M. Medina y J. M. Rodríguez.** 2006a. Enterococos en la industria alimentaria: ¿buenos, feos o malos? (I) Aspectos taxonómicos y presencia en hospedadores sanos. *Alim. Equip. Tecnol.* septiembre: 47–52.
- Fernández, L., E. Jiménez, R. Martín, E. Rodríguez, M. Medina y J. M. Rodríguez.** 2006b. Enterococos en la industria alimentaria: ¿buenos, feos o malos? (II). Desde probióticos hasta patógenos oportunistas. *Alim. Equip. Tecnol.* octubre: 50–55.
- Fernández, L. A. y V. de Lorenzo.** 2001. Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Mol. Microbiol.* 40: 332–346.
- Fernández, M., M. Martínez-Bueno, M. C. Martín, E. Valdivia y M. Maqueda.** 2007. Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1350–1361.
- Fett, W. F. y G. T. Maher.** 1985. Bacteriocin production by *Xanthomonas campestris* pv *glycines*. *Phytopathology* 75: 1280.

- Fimland, G., O. R. Blingsmo, K. Sletten, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer.** 1996. New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3313–3318.
- Fimland, G., R. Jack, G. Jung, I. F. Nes y J. Nissen-Meyer.** 1998. The bactericidal activity of pediocin PA-1 is specifically inhibited by a 15-mer fragment that spans the bacteriocin from the center towards the C terminus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 5057–5060.
- Fimland, G., L. Johnsen, L. Axelsson, M. B. Brurberg, I. F. Nes, V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *J. Bacteriol.* 182: 2643–2648.
- Fimland, G., V. G. H. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 2002. Comparative studies of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins. *Microbiology* 148: 3661–3670.
- Fimland, G., L. Johnsen, B. Dalhus y J. Nissen-Meyer.** 2005. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. *J. Pept. Sci.* 11: 688–696.
- Fleet, G. H.** 1999. Microorganisms in food ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 101–117.
- Fleet, G. H.** 2001. Wine. En: “*Food Microbiology: fundamentals and frontiers*”, pp. 671–694. Doyle, M. P., L. R. Beuchat y T. J. Montville (eds.). ASM Press, Nueva York, EE.UU.
- Flint, S.** 2000. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. En: “*Encyclopedia of food Microbiology*”, pp. 183–191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Floriano, M. B., J. L. Ruiz-Barba y R. Jiménez-Díaz.** 1998. Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4883–4890.
- Foegeding, P. M., A. B. Thomas, D. H. Pilkington y T. R. Klaenhammer.** 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 884–890.
- Folli, C., I. Ramazzina, P. Arcidiaco, M. Stoppini y R. Berni.** 2003. Purification of bacteriocin AS-48 from an *Enterococcus faecium* strain and analysis of the gene cluster involved in its production. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 143–149.
- Fontana, C., P. S. Cocconcelli y G. Vignolo.** 2005. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 131–142.
- Foulquié-Moreno, M. R., M. C. Rea, T. M. Cogan y L. de Vuyst.** 2003a. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 73–84.
- Foulquié-Moreno, M. R., R. Callewaert, B. Devreese, J. van Beeumen y L. de Vuyst.** 2003b. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J. Appl. Microbiol.* 94: 214–229.
- Foulquié-Moreno, M. R., P. Sarantinopoulos, E. Tsakalidou y L. de Vuyst.** 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1–24.
- Francia, M. V.** 2005. *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos en Europa: un problema hospitalario creciente. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23: 457–459.
- Franke, C. M.** 1998. Topology of a type I secretion system for bacteriocins of *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Franz, C. M. A. P., U. Schillinger y W. H. Holzapfel.** 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 255–270.
- Franz, C. M. A. P., W. H. Holzapfel y M. E. Stiles.** 1999a. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* 47: 1–24.

- Franz, C. M. A. P., R. W. Worobo, L. E. N. Quadri, U. Schillinger, W. H. Holzapfel, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1999b. Atypical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by *Enterococcus faecium* BFE 900. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2170–2178.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, R. W. Worobo, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 2000. Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology* 146: 621–631.
- Franz, C. M. A. P., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. K. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings y W. H. Holzapfel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4385–4389.
- Franz, C. M. A. P., M. E. Stiles, K. H. Schleifer y W. H. Holzapfel.** 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 105–122.
- Franz, C. M. A. P., M. J. van Belkum, W. H. Holzapfel, H. Abriouel y A. Gálvez.** 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 293–310.
- Fremaux, C., C. Ahn y T. R. Klaenhammer.** 1993. Molecular analysis of the lactacin F operon. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3906–3915.
- Fremaux, C., Y. Héchard e Y. Cenatiempo.** 1995. Mesentericin Y105 gene clusters in *Leuconostoc mesenteroides* Y105. *Microbiology* 141: 1637–1645.
- Fujii, T., K. Nakashima y N. Hayashi.** 2005. Random amplified polymorphic DNA-PCR based cloning of markers to identify the beer-spoilage strains of *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus collinoides* and *Lactobacillus coryniformis*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1209–1220.
- Gajic, O.** 2003. Relationships between MDR proteins, bacteriocin production and proteolysis in *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Gajic, O., G. Buist, M. Kojic, L. Topisirovic, O. P. Kuipers y J. Kok.** 2003. Novel mechanism of bacteriocin secretion and immunity carried out by lactococcal multidrug resistance proteins. *J. Biol. Chem.* 278: 34291–34298.
- Galán, D., R. Oliver y F. Estrany.** 2004. La cerveza. *Alim. Equip. Tecnol.* mayo: 47–50.
- Gall, H., W. -H. Boehncke y K. Gietzen.** 1996. Intolerance to sodium metabisulfite in beer. *Allergy* 51: 516–517.
- Gallagher, N. L. F., M. Sailer, W. P. Niemczura, T. T. Nakashima, M. E. Stiles y J. C. Vederas.** 1997. Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecyl phosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 36: 15062–15072.
- Gálvez, A., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno y E. Valdivia.** 1989. Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against Gram-positive and Gram-negative bacteria and other organisms. *Res. Microbiol.* 140: 57–68.
- Gálvez, A., E. Valdivia, H. Abriouel, E. Camafeita, E. Méndez, M. Martínez-Bueno y M. Maqueda.** 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Arch. Microbiol.* 171: 59–65.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López y N. Ben Omar.** 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 51–70.
- Gänzle, M. G., C. Hertel, J. M. B. M. van der Vossen y W. P. Hammes.** 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *Int. J. Food Microbiol.* 48: 21–35.
- Garde, S., M. Ávila, M. Medina y M. Nuñez.** 2004. Fast induction of nisin resistance in *Streptococcus thermophilus* INIA 463 during growth in milk. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 165–172.

- Gardiner, E. G., R. P. Ross, P. M. Kelly, C. Stanton, J. U. D. Collins y G. Fitzgerald.** 2002. Microbiology of therapeutic milks. En: "*Dairy Microbiology Handbook*", pp. 431–466. Robinson, R. K. (ed.). J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Garneau, S., N. I. Martin y J. C. Vederas.** 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84: 577–592.
- Garneau, S., A. C. A. Ference, M. J. van Belkum, M. E. Stiles y J. C. Vederas.** 2003 Purification and characterization of brochocin A and brochocin B (10-43), a functional fragment generated by heterologous expression in *Carnobacterium piscicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1352–1358.
- Garriga, M., T. Aymerich, S. Costa, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2000. Las altas presiones en combinación con bacteriocinas como nueva tecnología de conservación en productos cárnicos. *Eurocarne* 87: 59–63.
- Garriga, M., M. T. Aymerich, S. Costa, J. M. Monfort y M. Hugas.** 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19: 509–518.
- Garza-Velasco, R., K. Hernández-Acosta y A. G. Mejía-Chávez.** 2002. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *LABORAT-acta* 14: 11–20.
- Gasser, F.** 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur* 92: 45–67.
- Geisen, R. y W. H. Holzapfel.** 1996. Genetically modified starter and protective cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 315–324.
- Gellissen, G.** 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 741–750.
- Gelsomino, R., M. Vancanneyt, S. Condon, J. Swings y T. M. Cogan.** 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 177–188.
- Gelsomino, R., M. Vancanneyt, T. M. Cogan y J. Swings.** 2003. Effect of raw-milk cheese consumption on the enterococcal flora of human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 312–319.
- Gibbs, G. M., B. E. Davidson y A. J. Hillier.** 2004. Novel expression system for large-scale production and purification of recombinant class IIa bacteriocins and its application to piscicolin 126. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3292–3297.
- Gillor, O. y L. Ghazaryan.** 2007. Recent advances in bacteriocin application as antimicrobials. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2: 115–122.
- Gillor, O., L. M. Nigro y M. A. Riley.** 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.* 11: 1067–1075.
- Gilmore, M. S., R. A. Segarra, M. C. Booth, C. P. Bogie, L. R. Hall y D. B. Clewell.** 1994. Genetic structure of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335–7344.
- Giraffa, G.** 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in the dairy technology. *Food Microbiol.* 12: 291–299.
- Giraffa, G.** 2000. *Enterococcus*. En: "*Encyclopedia of Microbiology*", pp. 617–624, 2ª ed. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, San Diego, EE.UU.
- Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163–171.
- Giraffa, G.** 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215–222.
- Giraffa, G.** 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 251–260.
- Giraffa, G., E. Neviani y A. Veneroni.** 1990. Use of conductance to detect bacteriocin activity. *J. Food Prot.* 53: 772–776.
- Giraffa, G., D. Carminati y G. Torri Tarelli.** 1995. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. *J. Food Prot.* 58: 621–623.

- Giraffa, G., D. Carminati y E. Neviani.** 1997. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food. Prot.* 60: 732–737.
- Glenting, J., S. M. Madsen, A. Vrang, A. Fomsgaard y H. Israelsen.** 2002. A plasmid selection system in *Lactococcus lactis* and its use for gene expression in *L. lactis* and human kidney fibroblasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5051–5056.
- Gómez, B., A. Basanta, J. Sánchez, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2004a. Identificación y caracterización microbiológica de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen marino. *IV Congreso de Ciencias Veterinarias y Biomédicas*. Comunicaciones, III.4. Madrid, España.
- Gómez, B., A. Basanta, J. Sánchez, M. Martín, R. Criado, J. Gutiérrez, R. Citti, C. Herranz, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2004b. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and fish products. *XIII Colloque du Club des Bactéries Lactiques*. Poster, B2. Nantes, Francia.
- Gómez-Sala, B., M. Martín, D. B. Diep, C. Herranz, I. F. Nes, P. E. Hernández y L. M. Cintas.** 2006. *Lactobacillus curvatus* BCS35: a strain isolated from dry-salted cod (“bacalao”) producing two broad spectrum bacteriocins (curvacins G14 and G15) with a strong antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. *1st International Symposium Food, Veterinary and medical applications of antimicrobial peptides*. Poster, D09. Nantes, Francia.
- Gorgens, J. F., J. Planas, W. H. van Zyl, J. H. Knoetze y B. Hahn-Hagerdal.** 2004. Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by *S. cerevisiae* in defined medium. *Yeast* 21: 1205–1217.
- Gosalbes, M. J., C. D. Esteban, J. L. Galán y G. Pérez-Martínez.** 2000. Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4822–4828.
- Gould, G. W.** 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *J. Food Prot. (Suppl.)*: 82–86.
- Grande, M. J., R. Lucas, H. Abriouel, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, M. Martínez-Cañamero, E. Valdivia y A. Gálvez.** 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 289–297.
- Grande, M. J., R. Lucas, H. Abriouel, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006a. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 185–194.
- Grande, M. J., R. Lucas, H. Abriouel, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006b. Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from rosy cider by enterocin AS-48. *J. Appl. Microbiol.* 101: 422–428.
- Grande, M. J., R. L. López, H. Abriouel, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Maqueda, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2007a. Treatment of vegetable sauces with enterocin AS-48 alone or in combination with phenolic compounds to inhibit proliferation of *Staphylococcus aureus*. *J. Food. Prot.* 70: 405–411.
- Grande, M. J., H. Abriouel, R. L. López, E. Valdivia, N. Ben Omar, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2007b. Efficacy of enterocin AS-48 against bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. *J. Food. Prot.* 70: 2339–2345.
- Gravesen, A., P. Warthoe, S. Knochel y K. Thistrup.** 2000. Restriction fragment differential display of pediocin-resistant *Listeria monocytogenes* 412 mutants show consistent overexpression of a putative β -glucoside-specific PTS system. *Microbiology* 146: 2361–2369.
- Gravesen, A., K. Sørensen, F. M. Aarestrup y S. Knøchel.** 2001. Spontaneous nisin-resistant *Listeria monocytogenes* mutants with increased expression of a putative penicillin-binding protein and their sensitivity to various antibiotics. *Microb. Drug Resist.* 7: 127–135.
- Gravesen, A., A. -M. J. Axelsen, J. M. da Silva, T. B. Hansen y S. Knøchel.** 2002a. Frequency of bacteriocin resistance development and associated fitness costs in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 756–764.

- Gravesen, A., M. Ramnath, K. B. Rechinger, N. Andersen, L. Jänsch, Y. Héchard, J. W. Hastings y S. Knøchel.** 2002b. High-level resistance to class IIa bacteriocins is associated with one general mechanism in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 148: 2361–2369.
- Gravesen, A., B. Kallipolitis, K. Holmstrøm, P. E. Høiby, M. Ramnath y S. Knøchel.** 2004. pbp2229-mediated nisin resistance mechanism in *Listeria monocytogenes* confers cross-protection to class IIa bacteriocins and affects virulence gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1669–1679.
- Guder, A., I. Wiedemann y H.-G. Sahl.** 2000. Posttranslationally modified bacteriocins: the lantibiotics. *Biopolymers (Peptide Sci.)* 55: 62–73.
- Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2005. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1316–1325.
- Guinane, C. M., P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2006. Spontaneous resistance in *Lactococcus lactis* IL1403 to the lantibiotic lacticin 3147. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 77–83.
- Gutiérrez, J.** 2005. Caracterización inmunoquímica de la enterocina P y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens*, *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2004. Performance and applications of polyclonal anti-peptide antibodies specific for the enterococcal bacteriocin enterocin P. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2247–2255.
- Gutiérrez, J., R. Criado, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2005a. Production of enterocin P, an antilisterial pediocin-like bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3004–3008.
- Gutiérrez, J., D. Bourque, R. Criado, Y. J. Choi, L. M. Cintas, P. E. Hernández y C. B. Míguez.** 2005b. Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 125–131.
- Gutiérrez, J., R. Criado, R. Citti, M. Martín, C. Herranz, I. F. Nes, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2005c. Cloning, production and functional expression of enterocin P, a *sec*-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 239–250.
- Gutiérrez, J., R. Larsen, L. M. Cintas, J. Kok y P. E. Hernández.** 2006. High-level heterologous production and functional expression of the *sec*-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 41–51.
- Guyonnet, D., C. Fremaux, Y. Cenatiempo y J. M. Berjeaud.** 2000. Method for rapid purification of class IIa bacteriocins and comparison of their activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1744–1748.
- Hammond, J. R.** 1995. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. *Yeast* 11: 1613–1627.
- Han, X., L. B. Ye, B. Z. Li, G. Bo, W. J. Cai, Z. Hong, Y. L. She, Y. Li, L. B. Kong y Z. H. Wu.** 2006. Expression, purification and characterization of the hepatitis B virus entire envelope large protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49: 168–175.
- Hancock, R. E. W. y D. S. Chapple.** 1999. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1317–1323.
- Hancock, R. E. W. y A. Rozek.** 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 143–149.
- Hancock, R. E. W., T. Falla y M. Brown.** 1995. Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microbiol. Physiol.* 37: 135–175.
- Hanlin, M. B., N. Kalchayanand, P. Ray y B. Ray.** 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria in combination have greater antibacterial activity. *J. Food Prot.* 56: 252–255.
- Hardie, J. M. y R. A. Whiley.** 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 83: 1S–11S.

- Harris, L. J., H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer.** 1992a. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial *sauerkraut* fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1477–1483.
- Harris, L. J., H. P. Fleming y T. R. Klaenhammer.** 1992b. Novel paired starter culture system for *sauerkraut*, consisting of a nisin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* strain and a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1484–1489.
- Hartnett, D. J., A. Vaughan y D. van Sinderen.** 2002. Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. *J. Inst. Brew.* 108: 169–177.
- Hauge, H. H., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes y V. G. H. Eijsink.** 1998. Amphiphilic α -helices are important structural motifs in the α and β peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G. Enhancement of helix formation upon α - β interaction. *Eur. J. Biochem.* 251: 565–572.
- Håvarstein, L. S., H. Holo e I. F. Nes.** 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* 140: 2383–2389.
- Håvarstein, L. S., D. B. Diep e I. F. Nes.** 1995. A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol.* 16: 229–240.
- Hayashi, N., M. Ito, S. Horiike y H. Taguchi.** 2001. Molecular cloning of a putative divalent-cation transporter gene as a new genetic marker for the identification of *Lactobacillus brevis* strains capable of growing in beer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 596–603.
- Hayes, J. R., L. L. English, P. J. Carter, T. Proescholdt, K. Y. Lee, D. D. Wagner y D. G. White.** 2003. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7153–7160.
- Héchar, Y. y H.-G. Sahl.** 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84: 545–557.
- Héchar, Y., C. Pelletier, Y. Cenatiempo y J. Frère.** 2001. Analysis of σ^{54} -dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EII^{Man}) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiology* 147: 1575–1580.
- Helander, I. M., A. von Wright y T.-M. Mattila-Sandholm.** 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 146–150.
- Henderson, I.** 2004. The magic is in the simplicity. *Biotechnol. News Issue* 47.
- Henderson, J. T., A. L. Chopko y P. D. Dyck van Wassenaar.** 1992. Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1-0. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 5–12.
- Henning, S., R. Metz y W. R. Hammes.** 1986. Studies on the mode of action on nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 3: 121–134.
- Héquet, A., V. Laffitte, L. Simon, D. de Sousa-Caetano, C. Thomas, C. Fremaux y J. -M. Berjeaud.** 2007. Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *Int. J. Food. Microbiol.* 113: 67–74.
- Herranz, C.** 2001. Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de *Enterococcus faecium* de origen cárnico. Optimización de la producción y mecanismo molecular de acción de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Herranz, C. y A. J. M. Driessen.** 2005. Sec-mediated secretion of bacteriocin enterocin P by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1959–1963.
- Herranz, C., S. Mukhopadhyay, P. Casaus, J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, I. F. Nes, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 1999. Biochemical and genetic evidence of enterocin P production by two *Enterococcus faecium*-like strains isolated from fermented sausages. *Curr. Microbiol.* 39: 282–290.

- Herranz, C., L. M. Cintas, P. E. Hernández, G. N. Moll y A. J. M. Driessen. 2001a. Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 901–904.
- Herranz, C., P. Casaus, S. Mukhopadhyay, J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, I. F. Nes, P. E. Hernández y L. M. Cintas. 2001b. *Enterococcus faecium* P21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.* 18: 115–131.
- Herranz, C., Y. Chen, H.-J. Chung, L. M. Cintas, P. E. Hernández, T. J. Montville y M. L. Chikindas. 2001c. Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1689–1692.
- Herranz, C., J. M. Martínez, J. M. Rodríguez, P. E. Hernández y L. M. Cintas. 2001d. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 378–383.
- Hetz, C., M. R. Bono, L. F. Barros y R. Lagos. 2002. Microcin E492, a channel-forming bacteriocin from *Klebsiella pneumoniae*, induces apoptosis in some human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2696–2701.
- Heu, S., J. Oh, Y. Kang, S. Ryu, S. K. Cho, Y. Cho y M. Cho. 2001. *gly* gene cloning and expression and purification of glycinecin A, a bacteriocin produced by *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* 8ra. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4105–4110.
- Hickey, R. M., D. P. Twomey, R. P. Ross y C. Hill. 2001. Exploitation of plasmid pMRC01 to direct transfer of mobilizable plasmids into commercial lactococcal starter strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2853–2858.
- Hickey, R. M., D. P. Twomey, R. P. Ross y C. Hill. 2003. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology* 149: 655–664.
- Higgins, C. F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism - an overview. *Res. Microbiol.* 152: 205–210.
- Hill, C. y T. O’Keeffe. 2003. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of dairy sciences*”, pp. 129–135. Roginski, H., J. W. Fuqay y P. F. Fox (eds.). Academic Press, Bodmin, Reino Unido.
- Hoffmann, A., U. Pag, I. Wiedemann y H.-G. Sahl. 2002. Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. *Farmacol.* 57: 685–691.
- Holck, A., L. Axelsson, S. K. Hühne y L. Kröckel. 1994a. Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb674. *FEMS Microbiol. Lett.* 115: 143–149.
- Holck, A., L. Axelsson y U. Schillinger. 1994b. Purification and cloning of piscicolin 61, a bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* LV61. *Curr. Microbiol.* 29: 63–68.
- Hollenberg, C. P. y G. Gellissen. 1997. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 554–560.
- Hollerová, I. y P. Kubizniková. 2001. Monitoring Gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *J. Inst. Brew.* 107: 355–358.
- Holo H., O. Nissen e I. F. Nes. 1991. Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* 173: 3879–3887.
- Holtmark, I., V. G. H. Eijsink y M. B. Brurberg. 2008. Bacteriocins from plant pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 280: 1–7.
- Holzappel, W. H. y U. Schillinger. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.* 35: 109–116.
- Holzappel, W. H., R. Geisen y U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 343–362.
- Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger y J. H. J. Huis in’t Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85–101.
- Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez y H. M. Dodd. 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using lactococcin A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 818–823.

- Horn, N., M. I. Martínez, J. M. Martínez, P. E. Hernández, M. J. Gasson, J. M. Rodríguez y H. M. Dodd.** 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4443–4450.
- Horn, N., A. Fernández, H. M. Dodd, M. J. Gasson y J. M. Rodríguez.** 2004. Nisin-controlled production of pediocin PA-1 and colicin V in nisin- and non-nisin-producing *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5030–5032.
- Hornsey, I. S.** 1999. Elaboración de cerveza. Microbiología, bioquímica y tecnología. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España.
- Hough, J. S.** 1990. Biotecnología de la cerveza y de la malta. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España.
- Howell, T. H., J. P. Fiorellini, P. Blackburn, S. J. Projan, J. de la Harpe y R. C. Williams.** 1993. The effect of a mouthrinse based on nisin, a bacteriocin, on developing plaque and gingivitis in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.* 20: 335–339.
- Huang, J., C. Lacroix, H. Daba y R. E. Simard.** 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* in milk and its control by pediocin 5 produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. *Int. Dairy J.* 4: 429–443.
- Hugas, M.** 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* 49: S139–S150.
- Hugas, M., F. Pagés, M. Garriga y J. M. Monfort.** 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15: 639–650.
- Hugas, M., M. Garriga y M. T. Aymerich.** 2003. Functionality of enterococci in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 223–233.
- Hughenoltz, J. y G. de Veer.** 1991. Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. En: “*Nisin and Novel Lantibiotics*” pp. 440–447. Sahl, H. -G. y J. Jung (eds.). ESCOM Scientific Publishers BV, Leiden, Países Bajos.
- Hughenoltz, J., W. Sybesma, M. N. Groot, W. Wisselink, V. Ladero, K. Burgess, D. van Sinderen, J. C. Piard, G. Eggink, E. J. Smid, G. Savoy, F. Sesma, T. Jansen, P. Hols y M. Kleerebezem.** 2002. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 217–235.
- Hughes, B. F. y L. L. McKay.** 1991. Deriving phage-insensitive lactococci using a food-grade vector encoding phage and nisin resistance. *J. Dairy Sci.* 75: 914–923.
- Hummel, A. S., W. H. Holzapfel y C. M. A. P. Franz.** 2007a. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 1–7.
- Hummel, A. S., C. Hertel, W. H. Holzapfel y C. M. A. P. Franz.** 2007b. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 730–739.
- Hurst, A.** 1981. Nisin. En: “*Advances in Applied Microbiology, vol. 27*”. Perlman, D. y A. I. Laskin (eds.). Academic Press, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Huycke, M. M., M. S. Gilmore, B. D. Jett y J. L. Booth.** 1992. Transfer of pheromone-inducible plasmids between *Enterococcus faecalis* in the Syrian hamster gastrointestinal tract. *J. Infect. Dis.* 166: 1188–1191.
- Iijima, K., K. Suzuki, K. Ozaki y H. Yamashita.** 2006. *horC* confers beer-spoilage ability on hop-sensitive *Lactobacillus brevis* ABBC45cc. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1282–1288.
- Iijima, K., K. Suzuki, S. Asano, H. Kuriyama e Y. Kitagawa.** 2007. Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* genes clusters. *J. Inst. Brew.* 113: 96–101.
- Ilgen, C., J. L. Cereghino y J. M. Cregg.** 2005. *Pichia pastoris*. En: “*Production of recombinant proteins: novel microbial and eucaryotic expression systems*”, pp. 143–162. Gellissen, G. (ed.). Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania.
- Ingham, A. B., K. W. Sproat, M. L. V. Tizard y R. J. Moore.** 2005. A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 676–683.

- Ingledeu, W. M.** 1979. Effect of bacterial contamination on beer. A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 37: 145–150.
- Inoue, T., H. Tomita e Y. Ike.** 2006. Bac 32, a novel bacteriocin widely disseminated among clinical isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1202–1212.
- Iseppi, R., F. Pilati, M. Marini, M. Toselli, S. de Niederhäusern, E. Guerrieri, P. Messi, C. Sabia, G. Manicardi, I. Anacarso y M. Bondi.** 2008. Anti-listerial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *Int. J. Food. Microbiol.* (en prensa).
- Islam, B., S. N. Khan y A. U. Khan.** 2007. Dental caries: from infection to prevention. *Med. Sci. Monit.* 13: RA196–RA203.
- Jabrane, A., A. Sabri , P. Compère, P. Jacques, I. Vandenberghe, J. van Beeumen y P. Thonart.** 2002. Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5704–5710.
- Jack, R. W., J. R. Tagg y B. Ray.** 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171–200.
- Jack, R. W., J. Wan, J. Gordon, K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, R. E. Wettenhall, M. W. Hickey y M. J. Coventry.** 1996. Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG126. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2897–2903.
- Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch y E. Wollman.** 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Ann. Inst. Pasteur* 84: 222–224.
- Janes, M. E., R. Nannapaneni, A. Proctor y M. G. Johnson.** 1998. Rice hull ash and silicic acid as adsorbents for concentration of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4403–4409.
- Jennes, W., L. M. T. Dicks y D. J. Verwoerd.** 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. *J. Appl. Microbiol.* 88: 349–357.
- Jensen, L. B., A. M. Hammerum, R. L. Poulsen y H. Westh.** 1999. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 724–725.
- Jespersen, L.** 2003. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.* 3: 191–200.
- Jespersen, L. y M. Jakobsen.** 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 139–155.
- Jespersen, L., L. B. Cesar, P. G. Meaden y M. Jakobsen.** 1999. Multiple α -glucoside transporter genes in brewer's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 450–456.
- Jett, B. D., M. M. Huycke y M. S. Gilmore.** 1994. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 462–478.
- Jiménez-Díaz, R., J. L. Ruiz-Barba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten y P. J. Warner.** 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4459–4463.
- Joerger, R. D.** 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Sci.* 82: 640–647.
- Joerger, R. D., D. G. Hoover, S. F. Barefoot, K. M. Harmon, D. A. Grinstead y C. G. Nettles-Cutter.** 2000. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of Microbiology*” pp. 383–397, 2ª ed. Lederberg, J. (ed.). Academic Press, San Diego, EE.UU.
- Jofré, A., M. Garriga y T. Aymerich.** 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. *J. Food Prot.* 70: 2498–2502.
- Johansen, E.** 2003. Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. *Genet. Mol. Res.* 2: 112–116.

- Johnsen, L., G. Fimland, V. Eijsink y J. Nissen-Meyer.** 2000. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4798–4802.
- Johnsen, L., G. Fimland, D. Mantzilas y J. Nissen-Meyer.** 2004. Structure-function analysis of immunity proteins of pediocin-like bacteriocins: C-terminal parts of immunity proteins are involved in specific recognition of cognate bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2647–2652.
- Johnsen, L., G. Fimland y J. Nissen-Meyer.** 2005a. The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J. Biol. Chem.* 280: 9243–9250.
- Johnsen, L., B. Dalhus, D. Mantzilas y J. Nissen-Meyer.** 2005b. 1.6-Å crystal structure of entA-im: a bacterial immunity protein conferring immunity to the antimicrobial activity of the pediocin-like bacteriocin enterocin A. *J. Biol. Chem.* 280: 19045–19050.
- Joosten, H. M., M. Núñez, B. Devreese, J. van Beeumen y J. D. Marugg.** 1996. Purification and characterization of enterocin 4, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* INIA-4. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4220–4223.
- Jørgensen, A.** 1948. En “*Micro-organisms and fermentations*”, pp. 550. Griffin, Londres, Reino Unido.
- Jung, W. K., J. Y. Lim, N. H. Kwon, J. M. Kim, S. K. Hong, H. C. Koo, S. H. Kim e Y. H. Park.** 2007. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *Int. J. Food. Microbiol.* 113: 102–107.
- Kageyama, M.** 1964. Studies of a Pyocin: I. Physical and chemical properties. *J. Biochem. (Tokyo)* 55: 49–53.
- Kalchayanand, N., M. B. Hanlin y B. Ray.** 1992. Sublethal injury makes gram-negative and resistant gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 239–243.
- Kalchayanand, N., A. Sikes, C. P. Dunne y B. Ray.** 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 61: 425–431.
- Kaletta, C. y K.-D. Entian.** 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* 171: 1597–1601.
- Kalmokoff, M. L., F. Bartlett y R. M. Teather.** 1996. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? *J. Dairy Sci.* 79: 2297–2306.
- Kang, J. H. y M. S. Lee.** 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1169–1176.
- Katla, T., T. Møretrø, I. M. Aasen, A. L. Holck, L. Axelsson y K. Naterstad.** 2001. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol.* 18: 431–439.
- Kato, T., T. Matsuda, Y. Yoneyama, H. Kato y R. Nakamura.** 1993. Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 551–556.
- Kato, T., T. Matsuda, Y. Yoneyama, H. Kato y R. Nakamura.** 1994. Antibacterial substances produced by *Enterococcus faecium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 411–412.
- Kawai, Y., R. Kemperman, J. Kok y T. Saito.** 2004. The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5: 393–398.
- Kawamoto, S., J. Shima, R. Sato, T. Eguchi, S. Ohmomo, J. Shibato, N. Horikoshi, K. Takeshita y T. Sameshima.** 2002. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3830–3840.
- Kayser, F. H.** 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 255–262.
- Kazazic, M., J. Nissen-Meyer y G. Fimland.** 2002. Mutational analysis of the role of charged residues in target-cell binding, potency and specificity of the pediocin-like bacteriocin sakacin P. *Microbiology* 148: 2019–2027.

- Kemperman, R., A. Kuipers, H. Karsens, A. Nauta, O. Kuipers y J. Kok.** 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A y closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1589–1597.
- Keren, T., M. Yarmus, G. Halevy y R. Shapira.** 2004. Immunodetection of the bacteriocin lactacin RM: analysis of the influence of temperature and Tween 80 on its expression and activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2098–2104.
- Kim, T.-S., J.-W. Hur, M.-A. Yu, C.-I. Cheigh, K.-N. Kim, J.-K. Hwang e Y.-R Pyun.** 2003. Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Food. Prot.* 66: 3–12.
- Kim, W. J., R. J. Hall y N. W. Dunn.** 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 449–453.
- Klaenhammer, T. R.** 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337–349.
- Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39–86.
- Klare, I., G. Werner y W. Witte.** 2001. Enterococci: habitats, infections, virulence factors, resistances to antibiotics, transfer of resistance determinants. En: “*Emerging bacterial pathogens. Contrib. Microbiol., vol. 8*”, pp. 108–122. Mühlhofer, I. y K. P. Schäfer (eds.). Basel/Karger, Suiza.
- Klare, I., C. Konstabel, D. Badstübner, G. Werner y W. Witte.** 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 269–290.
- Kleerebezem, M. y L. E. Quadri.** 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* 22: 1579–1596.
- Kleerebezem, M., L. E. N. Quadri, O. P. Kuipers y W. M. de Vos.** 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895–904.
- Klein, C. y K. D. Entian.** 1994. Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2793–2801.
- Klein, G.** 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 123–131.
- Klein, G. y A. Pack.** 1997. Antibiotic resistance and transfer of *vanA*-mediated resistance of enterococci used in animal nutrition. *Microecol. Ther.* 26: 257–268.
- Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte y G. Reuter.** 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 103–125.
- Klibi, N., A. Jouini, B. Rojo-Bezares, A. Masmoudi, F. Ruiz-Larrea, A. Boudabous y C. Torres.** 2008. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in clinical *enterococcal* isolates of Tunisia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 653–657.
- Klocke, M., K. Mundt, F. Idler, S. Jung y J. E. Backhausen.** 2005. Heterologous expression of enterocin A, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*, fused to a cellulose-binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with inhibitory activity against *Listeria*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 532–538.
- Koch, S., M. Hufnagel, C. Theilacker y J. Huebner.** 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22: 822–830.
- Koivula, T. T., R. Juvonen, A. Haikara y M. -L. Suihko.** 2006. Characterization of the brewery spoilage bacterium *Obesumbacterium proteus* by automated ribotyping and development of PCR methods for its biotype 1. *J. Appl. Microbiol.* 100: 398–406.
- Kok, J., G. Buist, A. L. Zomer, S. A. F. T. van Hijum y O. P. Kuipers.** 2005. Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 411–433.
- Komitopoulou, E., I. S. Boziaris, E. A. Davies, J. Delves-Broughton y M. R. Adams.** 1999. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34: 81–85.

- Konings, W. N., J. Kok, O. P. Kuipers y B. Poolman.** 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Op. Microbiol.* 3: 276–282.
- Konisky, J.** 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 125–144.
- Kozak, M.** 1992. Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8:197–225.
- Kramer, N. E.** 2005. Nisin resistance in Gram-positive bacteria. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Kramer, N. E., S. A. F. T. van Hijum, J. Knol, J. Kok y O. P. Kuipers.** 2006. Transcriptome analysis reveals mechanisms by which *Lactococcus lactis* acquires nisin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1753–1761.
- Kreil, G.** 1994. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an overview. En: “*Antimicrobial Peptides*”, pp. 77–90. Bomam, H. G., J. Marsh y J. A. Goode (eds.). Wiley, Nueva York, EE.UU.
- Krier, F., A. M. Revol-Junelles y P. Germain.** 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 359–363.
- Kühn, I., A. Iversen, L. G. Burman, B. Olsson-Liljequist, A. Franklin, M. Finn, F. Aarestrup, A. M. Seyfarth, A. R. Blanch, X. Vilanova, H. Taylor, J. Caplin, M. A. Moreno, L. Domínguez, I. A. Herrero y R. Möllby.** 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans and the environment - a European study. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 133–145.
- Kuipers, A., E. de Boef, R. Rink, S. Fekken, L. D. Kluskens, A. J. M. Driessen, K. Leenhouts, O. P. Kuipers y G. N. Moll.** 2004. NisT, the transporter of the lantibiotic nisin, can transport fully modified, dehydrated, and unmodified prenisin and fusions of the leader peptide with non-lantibiotic peptides. *J. Biol. Chem.* 279: 22176–22182.
- Kuipers, A., J. Wierenga, R. Rink, L. D. Kluskens, A. J. M. Driessen, O. P. Kuipers y G. N. Moll.** 2006. Sec-mediated transport of posttranslationally dehydrated peptides in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7626–7633.
- Kuipers, O. P., M. M. Beerthuyzen, P. G. G. A. de Ruyter, E. J. Luesink y W. M. de Vos.** 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270: 27299–27304.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1997. Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol.* 15: 135–140.
- Kuipers, O. P., P. G. G. A. de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1998. Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64: 15–21.
- Kuroda, K. y R. Kagiya.** 1983. Biochemical relationship among three F-type pyocins, pyocin F1, F2, and F3, and phage KF1. *J. Biochem.* 94: 1429–1441.
- Larsen, A. G. y B. Nørrung.** 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 132–134.
- Lauková, A. y S. Czikková.** 1998. Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 215–218.
- Lauková, A. y S. Czikková.** 1999. The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 87: 182–186.
- Lauková, A. y S. Czikková.** 2001. Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on “bryndza”, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiol. Res.* 156: 31–34.
- Lauková, A., M. Mareková y P. Javorsky.** 1993. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4321. *Lett. Appl. Microbiol.* 16: 257–260.

- Lauková, A., S. Czikková, Z. Vasilková, P. Juris e I. Krupicer.** 1998a. Antimicrobial effect of enterocin CCM 4231 in the cattle slurry environment. *Cytobios* 94: 73–79.
- Lauková, A., S. Czikková, Z. Vasilková, P. Juris y M. Mareková.** 1998b. Occurrence of bacteriocin production among environmental enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 178–182.
- Lauková, A., S. Czikková, T. Dobransky y O. Burdova.** 1999a. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. *Food Microbiol.* 16: 93–99.
- Lauková, A., S. Czikková, S. Laczková y P. Turek.** 1999b Use of enterocins CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornád salami. *Int. J. Food Microbiol.* 52: 115–119.
- Lauková, A., P. Juriš, Z. Vasilková e I. Papajová.** 2000. Treatment of sanitary-important bacteria by bacteriocin substance V24 in cattle dung water. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 402–405.
- Lauková, A., P. Švec, V. Strompfová, V. Štětina e I. Sedláček.** 2007. Properties of the strains *Enterococcus haemoperoxidus* and *E. moraviensis*, new species among enterococci. *Folia Microbiol. (Praha)* 52: 273–279.
- Lautenbach, E., L. A. LaRosa, A. M. Marr, I. Nachamkin, W. B. Bilker y N. O. Fishman.** 2003. Changes in the prevalence of vancomycin-resistant enterococci in response to antimicrobial formulary interventions: impact of progressive restrictions on use of vancomycin and third-generation cephalosporins. *Clin. Infect. Dis.* 36: 440–446.
- Lawton, E. M., R. P. Ross, C. Hill y P. D. Cotter.** 2007. Two-peptide lantibiotics: a medical perspective. *Mini Rev. Med. Chem.* 7: 1236–1247.
- Leclerc, H., L. A. Devriese y D. A. A. Mossel.** 1996. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their uses as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 459–466.
- Lee, Y. -K. y S. Salminen.** 1995. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 241–245.
- Leenhouts, K., A. Bolhuis, G. Venema y J. Kok.** 1998. Construction of a food-grade multicopy integration system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 417–423.
- Leer, R. J., J. M. van der Vossen, M. van Giezen, J. M. van Noort y P. H. Pouwels.** 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* 141: 1629–1635.
- Lehrer, R. I., A. K. Lichtenstein y T. Ganz.** 1993. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev. Immunol.* 11: 105–128.
- Leisner, J. J., G. G. Greer y M. E. Styles.** 1996. Control of beef spoilage by a sulfide-producing *Lactobacillus sake* strain with bacteriocinogenic *Leuconostoc gelidum* UAL187 during anaerobic storage at 2 degrees C. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2610–2614.
- Leistner, L.** 1992. Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.* 25: 151–158.
- Leistner, L.** 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55: 181–186.
- Leistner, L. y L. G. M. Gorris.** 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 41–46.
- Lejeune, R., R. Callewaert, K. Crabbé y L. de Vuyst.** 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Microbiol.* 84: 159–168.
- Leroy, F. y L. de Vuyst.** 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 974–981.
- Leroy, F. y L. de Vuyst.** 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 155–164.
- Leroy, F. y L. de Vuyst.** 2003. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67–78.

- Leroy, F. y L. de Vuyst.** 2005. Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *Int. J. Food Microbiol.* 100: 141–152.
- Leroy, F., J. Verluyten, W. Messens y L. de Vuyst.** 2002. Modelling contributes to the understanding of the different behaviour of bacteriocin-producing strains in a meat environment. *Int. Dairy J.* 12: 247–253.
- Leroy, F., J. Verluyten y L. de Vuyst.** 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 270–285.
- Lester, C. H., N. Frimodt-Møller y A. M. Hammerum.** 2004. Conjugal transfer of aminoglycoside and macrolide resistance between *Enterococcus faecium* isolates in the intestine of streptomycin-treated mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 235: 385–391.
- Leung, P. P., M. Khadre, T. H. Shellhammer y A. E. Yousef.** 2002. Immunoassay method for quantitative determination of nisin in solution and on polymeric films. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 199–204.
- Leversee, J. A. y B. A. Glatz.** 2001. Detection of the bacteriocin propionin PLG-1 with polyvalent anti-PLG-1 antiserum. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2235–2239.
- Lewin, B.** 2004. The *Sec* system transports proteins into and through the inner membrane. En: “*Genes VIII*”, pp. 221–222. Carlson, G. y J. Challice (eds). Pearson Education, Inc., New Jersey, EE.UU.
- Lewis, D.** 1998. Biological mash and wort acidification. *New Brewer* 15: 36–45.
- Li, P., A. Anumanthan, X. G. Gao, K. Ilangoan, V. V. Suzara, N. Düzgünes y V. Renugopalakrishnan.** 2007. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142: 105–124.
- Licht, T. R., D. Laugesen, L. B. Jensen y B. L. Jacobsen.** 2002. Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* microorganisms colonizing the intestine of mini-pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 187–193.
- Limonet, M., A. -M. Revol-Junelles y J. -B. Millière.** 2002. Variations in the membrane fatty acid composition of resistant or susceptible *Leuconostoc* or *Weissella* strains in the presence or absence of mesenterocin 52A and mesenterocin 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2910–2916.
- Limonet, M., A. -M. Revol-Junelles, C. Cailliez-Grimal y J. -B. Millière.** 2004a. Synergistic mode of action of mesenterocins 52A and 52B produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52. *Curr. Microbiol.* 48: 204–207.
- Limonet, M., C. Cailliez-Grimal, M. Linder, A.-M. Revol-Junelles y J.-B. Millière.** 2004b. Cell envelope analysis of insensitive, susceptible or resistant strains of *Leuconostoc* and *Weissella* genus to *Leuconostoc mesenteroides* FR 52 bacteriocins. *FEMS Microbiol. Lett.* 241: 49–55.
- Lin, S. -H., S. Miyata, W. Weng, W. Matsunaga, J. Ichikawa, K. Furuya, T. Nakashima, T. Kiyohara, O. P. Kuipers, P. G. G. A de Ruyter, M. Kleerebezem y W. M. de Vos.** 1998. Quorum sensing controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64: 15–21.
- Line J. E., E. A. Svetoch, B. V. Eruslanov, V. V. Pereygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, V. P. Levchuk, O. E. Svetoch, B. S. Seal, G. R. Siragusa y N. J. Stern.** 2008. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1094–1100.
- Linko, M., A. Haikara, A. Ritala y M. Penttilä.** 1998. Recent advances in the malting and brewing industry. *J. Biotechnol.* 65: 85–98.
- Liu, L., P. O’Conner, P. D. Cotter, C. Hill y R. P. Ross.** 2008. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1059–1066..
- Ljungh, A. y T. Wadström.** 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7: 73–89.
- Lohner, K. y E. J. Prenner.** 1999. Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 141–156.

- López-Lara, I., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. Maqueda y E. Valdivia.** 1991. Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can. J. Microbiol.* 37: 769–774.
- Losteinkit, C., K. Uchiyama, S. Ochi, T. Takaoda, K. Nagahisa y S. Shioya.** 2001. Characterization of bacteriocin N15 produced by *Enterococcus faecium* N15 and cloning of the related genes. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 390–395.
- Lu, H.-Z., X.-H. Weng, H. Li, Y.-K. Yin, M.-Y. Pang y T.-W. Tang.** 2002. *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to human. *J. Clin. Microbiol.* 40: 913–917.
- Lucas, R., M. J. Grande, H. Abriouel, M. Maqueda, N. Ben Omar, E. Valdivia, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food Chem. Toxicol.* 44: 1774–1781.
- Luchansky, J. B., K. A. Glass, K. D. Harsono, A. J. Degnan, N. G. Faith, B. Cauvin, G. Baccus-Taylor, K. Arihara, B. Bater, A. J. Maurer y R. G. Cassens.** 1992. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3053–3059.
- Lücke, F.-K.** 2000. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56: 105–115.
- Lüders, T., G. A. Birkemo, G. Fimland, J. Nilssen-Meyer e I. F. Nes.** 2003. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1797–1799.
- Lund, B., C. Agvald-Ohman, A. Hultberg y C. Edlund.** 2002. Frequent transmission of enterococcal strains between mechanically ventilated patients treated at an intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2084–2088.
- Lyon, W. J., D. G. Olson y E. A. Murano.** 1995. Isolation and purification of enterocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. *J. Food Prot.* 58: 890–898.
- MacEachern, P., J. P. Giannoccaro, S. Elsayed, R. R. Read y K. B. Laupland.** 2005. A rare case of pleuropulmonary infection and septic shock associated with *Enterococcus faecium* endocarditis. *J. Infect.* 50: 84–88.
- Madrau, M. A., N. P. Mangia, M. A. Murgia, M. G. Sanna, G. Garau, L. Leccis, M. Caredda y P. Deiana.** 2006. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *Int. Dairy J.* 16: 876–885.
- Magnus, C. A., W. M. Ingledew y A. R. McCurdy.** 1986. Thermal resistance of streptococci isolated from pasteurized ham. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 19: 62–67.
- Mahapatra, A. K., K. Muthukumarappan y J. L. Julson.** 2005. Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45: 447–461.
- Maisnier-Patin, S., N. Deschamps, S. R. Tatini y J. Richard.** 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* 72: 249–263.
- Maisnier-Patin, S., E. Forni y J. Richard.** 1996. Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 255–270.
- Majhenič, A. Č., I. Rogelf y B. Perko.** 2005. Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *Int. J. Food. Microbiol.* 102: 239–244.
- Makrides, S. C.** 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60: 512–538.
- Mannu, L., A. Paba, E. Daga, R. Comunian, S. Zanetti, I. Duprè y L. A. Sechi.** 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 291–304.
- Mantovani, H. C. y J. B. Russell.** 2001. Nisin resistance of *Streptococcus bovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 808–813.

- Mantovani, H. C. y J. B. Russell.** 2002. The ability of a bacteriocin of *Streptococcus bovis* HC5 (bovicin HC5) to inhibit *Clostridium aminophilum*, an obligate amino acid fermenting bacterium from the rumen. *Anaerobe* 8: 247–252.
- Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, I. Guerra y E. Valdivia.** 1993. Neutralizing antibodies against the peptide antibiotic AS-48: immunocytological studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 148–151.
- Maqueda, M., A. Gálvez, M. Martínez-Bueno, M. J. Sánchez-Barrena, C. González, A. Albert, M. Rico y E. Valdivia.** 2004. Peptide AS-48: prototype of a new class of cyclic bacteriocins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5: 399–416.
- Maqueda, M., M. Sánchez-Hidalgo, M. Fernández, M. Montalbán-López, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno.** 2008. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 2–22.
- Marciset, O., M. C. Jeronimus-Stratingh, B. Mollet y B. Poolman.** 1997. Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 14277–14284.
- March, C., J. J. Manclús, A. Abad, A. Navarro y A. Montoya.** 2005. Rapid detection and counting of viable beer-spoilage lactic acid bacteria using a monoclonal chemiluminescence enzyme immunoassay and a CCD camera. *J. Immunol. Methods* 303: 92–104.
- Mareková, M., A. Lauková, L. de Vuyst, M. Skaugen e I. F. Nes.** 2003. Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain of *Enterococcus faecium* EK13. *J. Appl. Microbiol.* 94: 523–530.
- Mareková, M., A. Lauková, M. Skaugen e I. F. Nes.** 2007. Isolation and characterization of a new bacteriocin, termed enterocin M, produced by environmental isolate *Enterococcus faecium* AL41. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 533–537.
- Marino, M., M. Maifreni y G. Rondinini.** 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 133–140.
- Marothi, Y. A., H. Agnihotri y D. Dubey.** 2005. Enterococcal resistance: an overview. *Indian J. Med. Microbiol.* 23: 214–219.
- Martín, B., M. Garriga, M. Hugas y T. Aymerich.** 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1177–1190.
- Martín, M.** 2006. Identificación y evaluación de la expresión de genes que codifican bacteriocinas y detección de factores potenciales de virulencia de enterococos aislados de palomas torcaces (*Columba palumbus*). Caracterización bioquímica y genética de la columbicina A de *Enterococcus columbae* PLCH2 y construcción de quimeras génicas que permiten la producción y expresión funcional de la enterocina A y la pediocina PA-1 y su coproducción con la nisina A en cepas recombinantes de *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, R. Citti, J. Sánchez, A. Basanta, B. Gómez, C. Herranz, M. F. Fernández, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2003. Evaluación de la presencia de genes estructurales que codifican bacteriocinas de enterococos aislados de animales de interés alimentario. En: “*Bacteriocinas de Bacterias Lácticas en la Mejora de la Calidad de los Alimentos*”, pp. 11–26. Medina, M. y M. Núñez (eds.). Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, España.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Prot.* 69: 520–531.
- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007a. Cloning, production and expression of the bacteriocin enterocin A produced by *Enterococcus faecium* PLBC21 in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 667–675.

- Martín, M., J. Gutiérrez, R. Criado, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007b. Chimeras of mature pediocin PA-1 fused to the signal peptide of enterocin P permits the cloning, production, and expression of pediocin PA-1 in *Lactococcus lactis*. *J. Food Prot.* 70: 2792–2798.
- Martín, M. C., J. C. Alonso, J. E. Suárez y M. A. Álvarez.** 2000. Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2599–2604.
- Martín, R.** 2005. Origen y potencial prebiótico de la microbiota de la leche materna. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martín-Platero, A. M., E. Valdivia, M. Ruiz-Rodríguez, J. J. Soler, M. Martín-Vivaldi, M. Maqueda y M. Martínez-Bueno.** 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4245–4249.
- Martínez, B., A. Rodríguez y J. E. Suárez.** 2000a. Lactococcin 972, a bacteriocin that inhibits septum formation in lactococci. *Microbiology* 146: 949–955.
- Martínez, J. M.** 2000. Producción y empleo de anticuerpos de especificidad predeterminada para la detección, cuantificación y purificación de las bacteriocinas pediocina PA-1 y enterocina A y para el reconocimiento específico de su (co)expresión heteróloga en *Lactococcus lactis*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Martínez, J. M., M. I. Martínez, A. M. Suárez, C. Herranz, P. Casaus, L. M. Cintas, J. M. Rodríguez y P. E. Hernández.** 1998. Generation of polyclonal antibodies of predetermined specificity against pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4536–4545.
- Martínez, J. M., M. I. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez, M. F. Fernández, J. M. Rodríguez y P. E. Hernández.** 1999. Antibodies to a synthetic 1-9-N-terminal amino acid fragment of mature pediocin PA-1: sensitivity and specificity for pediocin PA-1 and cross-reactivity against class IIa bacteriocins. *Microbiology* 145: 2777–2787.
- Martínez, J. M., J. Kok, J. W. Sanders y P. E. Hernández.** 2000b. Heterologous coproduction of enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3543–3549.
- Martínez, J. R., A. L. Villarino y J. M. Cobo.** 2001. Cerveza sin alcohol. Sus propiedades. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (SEDCA), Madrid, España.
- Martínez, M. I., J. M. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez y J. M. Rodríguez.** 2000c. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 1. Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria* 314: 59–66.
- Martínez, M. I., J. M. Martínez, C. Herranz, A. M. Suárez y J. M. Rodríguez.** 2000d. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. 2. Modo de acción, biosíntesis, aplicaciones y tendencias futuras. *Alimentaria* 314: 67–74.
- Martínez, S., M. López y A. Bernardo.** 2003. Los enterococos en los alimentos: interés tecnológico y sanitario. *Alim. Equip. Tecnol.* febrero: 111–120.
- Martínez-Bueno, M., A. Gálvez, E. Valdivia y M. Maqueda.** 1990. A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 172: 2817–2818.
- Martínez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Gálvez y M. Maqueda.** 1992. Transfer of a plasmid determining bacteriocin Bc-48 production and immunity, and response to sexual pheromones in *Enterococcus faecalis* S-48. *Plasmid* 28: 61–69.
- Martínez-Bueno, M., M. Maqueda, A. Gálvez, B. Samyn, J. van Beeumen, J. Coyette y E. Valdivia.** 1994. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* 176: 6334–6339.
- Martínez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Gálvez, J. Coyette y M. Maqueda.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* 27: 347–358.

- Martínez-Cuesta, M. C., J. Kok, E. Herranz, C. Peláez, T. Requena y G. Buist.** 2000. Requirement of autolytic activity for bacteriocin-induced lysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3174–3179.
- Martínez-Cuesta, M. C., T. Requena y C. Peláez.** 2001. Use of a bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 79–88.
- Marugg, J. D., C. F. Gonzalez, B. S. Kunka, A. M. Ledebor, M. J. Pucci, M. Y. Toonen, S. A. Walker, L. C. M. Zoetmulder y P. A. Vandenberg.** 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2360–2367.
- Mathur, S. y R. Singh.** 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 281–295.
- Matsuzaki, K.** 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 1–10.
- Maugeret, T. M. J. y S. L. Walker.** 2002. Rapid detection of *Obesumbacterium proteus* from yeast and wort using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 281–284.
- Mazzotta, A. S. y T. J. Montville.** 1997. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin-resistant strains at 10°C and 30°C. *J. Appl. Microbiol.* 82: 32–38.
- Mazzotta, A. S. y T. J. Montville.** 1999. Characterization of fatty acid composition, spore germination, and thermal resistance in a nisin-resistant mutant of *Clostridium botulinum* 169B and in the wild-type strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 659–664.
- McAuliffe, O., C. Hill y R. P. Ross.** 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 86: 251–256.
- McCormick, J. K., R. W. Worobo y M. E. Stiles.** 1996. Expression of the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 by a signal peptide-dependent general secretory pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4095–4099.
- McCormick, J. K., A. Poon, M. Sailer, Y. Gao, K. L. Roy, L. M. McMullen, J. C. Vederas, M. E. Stiles y M. J. van Belkum.** 1998. Genetic characterization and heterologous expression of brochocin-C, an antibotulinal, two-peptide bacteriocin produced by *Brochothrix campestris* ATCC 43754. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4757–4766.
- McGowan, L. L., C. R. Jackson, J. B. Barrett, L. M. Hiott y P. J. Fedorka-Cray.** 2006. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. *J. Food Prot.* 69: 2976–2982.
- McMullen, L. M. y M. E. Stiles.** 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot. (Suppl.)*: 64–71.
- Messens, W., J. Verluyten, F. Leroy y L. de Vuyst.** 2003. Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 41–52.
- Michel-Briand, Y. y C. Baysse.** 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84: 499–510.
- Michiels, J., G. Dirix, J. Vanderleyden y C. Xi.** 2001. Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 9: 164–168.
- Miller, K. W., R. Schamber, O. Osmanagaoglu y B. Ray.** 1998. Isolation and characterization of pediocin ACh chimeric protein mutants with altered bactericidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1997–2005.
- Modi, K. D., M. L. Chikindas y T. J. Montville.** 2000. Sensitivity of nisin-resistant *Listeria monocytogenes* to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 249–253.
- Mofredj, A., H. Bahloul y C. Chanut.** 2007. *Lactococcus lactis*: an opportunistic bacterium?. *Med. Mal. Infect.* 37: 200–207.

- Molina, J. L.** 1987. La cebada cervecera (calidad, cultivo y nociones sobre fabricación de malta y cerveza). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España.
- Moll, G., T. Ubbink-Kok, H. Hildeng-Hauge, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, W. N. Konings y A. J. M. Driessen.** 1996. Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two component bacteriocin. *J. Bacteriol.* 178: 600–605.
- Moll, G. N., E. van den Akker, H. H. Hauge, J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, W. N. Konings y A. J. M. Driessen.** 1999a. Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. *J. Bacteriol.* 181: 4848–4852.
- Moll, G. N., W. N. Konings y A. J. M. Driessen.** 1999b. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 185–198.
- Montville, T. J. y M. E. C. Bruno.** 1994. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 53–74.
- Montville, T. J. e Y. Chen.** 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 511–519.
- Moon, G. S y W. Yung.** 2005. Partial characterization and purification of enterocin K25 linked to the plasmid in *Enterococcus* sp. K25. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 53–58.
- Morandi, S., M. Brasca, C. Andrighetto, A. Lombardi y R. Lodi.** 2006. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *Int. Dairy J.* 16: 867–875.
- Moreira, W. L.** 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Moreno, M. R. F., J. J. Leisner, L. K. Tee, C. Ley, S. Radu, G. Rusul, M. Vancanneyt y L. de Vuyst.** 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Appl. Microbiol.* 92: 147–157.
- Møretro, T., I. M. Aasen, I. Storro y L. Axelsson.** 2000. Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *J. Appl. Microbiol.* 88: 536–545.
- Morgan, S. M., M. Galvin, R. P. Ross y C. Hill.** 2001. Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. *Lett. Appl. Microbiol.* 33: 387–391.
- Mori, H. y K. Ito.** 2001. The Sec protein-translocation Pathway. *Trends Microbiol.* 9: 494–500.
- Morovsky, M., P. Pristas, P. Javorsky, I. F. Nes y H. Holo.** 2001. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the *entA* gene among ruminal gram-positive cocci. *Microbiol. Res.* 156: 133–138.
- Morisset, D. y J. Frère.** 2002. Heterologous expression of bacteriocins using the mesentericin Y105 dedicated transport system by *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochimie.* 84: 569–576.
- Morrison, D., N. Woodford y B. Cookson.** 1997. Enterococci as emerging pathogens in humans. *J. Appl. Microbiol.* 83: 89S–99S.
- Mulet-Powell, N., A. M. Lacoste-Armynot, M. Viñas y M. S. de Buochberg.** 1998. Interactions between pairs of bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 61: 1210–1212.
- Muller, S., T. Sandal, P. Kamp-Hansen y H. Dalbøge.** 1998. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Y. lipolytica*. *Yeast* 14: 1267–1283.
- Multon, J. L.** 2000. Bebidas (vino, cerveza, zumo de frutas, soda...). En “Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias”, pp. 727–735. Editorial Acirbia S.A., Zaragoza, España.
- Mundt, J. O.** 1986. Genus *Enterococcus*. En: “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2”, pp. 1063–1065. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, EE.UU.

- Mundy, L. M., D. F. Sahm y M. Gilmore.** 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 513–522.
- Muraki, M.** 2006. Secretory expression of synthetic human Fas ligand extracellular domain gene in *Pichia pastoris*: influences of tag addition and *N*-glycosylation site deletion, and development of a purification method. *Protein Expr. Purif.* 50: 137–146.
- Muriana, P. M. y T. R. Klaenhammer.** 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 114–121.
- Murray, B. E.** 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 37–47.
- Nagao, J., S. M. Asaduzzaman, Y. Aso, K. Okuda, J. Nakayama y K. Sonomoto.** 2006. Lantibiotics: insight and foresight for the new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 139–149.
- Naghmouchi, K., E. Kheadr, C. Lacroix e I. Fliss.** 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 24: 718–727.
- Nakakita, Y., T. Takahashi, Y. Tsuchiya, J. Watari y K. Shinotsuka.** 2002. A strategy for detection of all beer-spoilage bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 60: 63–67.
- Nandiwada, L. S., G. P. Schamberger, H. W. Schafer y F. Diez-Gonzalez.** 2004. Characterization of an E2-type colicin and its application to treat alfalfa seeds to reduce *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* 93: 267–279.
- Naruse, N., O. Tenmyo, K. Tomita, M. Konishi, T. Miyaki, H. Kawaguchi, K. Fukase, T. Wakamiya y T. Shiba.** 1989. Lanthiopeptin, a new peptide antibiotic. Production, isolation and properties of lanthiopeptin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 42: 837–845.
- Naumova, E. S., G. I. Naumov, I. Masneuf-Pomarède y M. Aigle.** 2005. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* 22: 1099–1115.
- Nauth, K. R.** 2002. Prevention of lactic acid bacteria spoilage of beer through the use of bacteriocin-containing fermented wort. *U.S. Patent*: 0192331A1.
- Navarro, L., M. Zarazaga, J. Sáenz, F. Ruiz-Larrea y C. Torres.** 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J. Appl. Microbiol.* 88: 44–51.
- NCCLS.** 2002. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twelfth Informational Supplement of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Handbook, vol. 21.
- Neetoo, H., M. Ye y H. Chen.** 2007. Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 70: 1267–1271.
- Nes, I. F. y V. G. H. Eijsink.** 1999. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. En: “*Cell-Cell Signaling in Bacteria*”, pp. 175–192. Dunny, G. M. y S. C. Winans (eds.). American Society for Microbiology, Washington D.C., EE.UU.
- Nes, I. F. y H. Holo.** 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 55: 50–61.
- Nes, I. F. y O. Johnsborg.** 2004. Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 100–104.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havårstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink y H. Holo.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 113–128.
- Nes, I. F., H. Holo, G. Fimland, H. H. Hauge y J. Nissen-Meyer.** 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 81–115. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Nes, I. F., T. Forberg, Z. Selhian y H. Holo.** 2005. The antimicrobial activity of enterococci obtained from faeces of breast-fed babies. *2nd International ASM-FEMS Conference on Enterococci*. Poster A39. Helsingør, Dinamarca.

- Nes, I. F., D. B. Diep y H. Holo. 2007. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189: 1189–1198.
- Nettles, C. G. y S. F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 56: 338–356.
- Netz, D. J. A., H. -G. Sahl, R. Marcolino, J. dos Santos-Nascimento, S. S. de Oliveira, M. B. Soares y M. C. F. Bastos. 2001. Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 311: 939–949.
- Netz, D. J. A., R. Pohl, A. G. Beck-Sicking, T. Selmer, A. J. Pierik, M. C. F. Bastos y H. -G. Sahl. 2002. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 319: 745–756.
- Neu, T. y B. Henrich. 2003. New thermosensitive delivery vector and its use to enable nisin-controlled gene expression in *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1377–1382.
- Neysens, P., W. Messens, D. Gevers, J. Swings y L. de Vuyst. 2003. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. *Microbiology* 149: 1073–1082.
- Nguyen, H. A., T. Tomita, M. Hirota, J. Kaneko, T. Hayashi e Y. Kamio. 2001. DNA inversion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er. *J. Bacteriol.* 183: 6274–6281.
- Nguyen, T. D. T., J. H. Kang y M. S. Lee. 2007. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 358–361.
- Nieto-Lozano, J. C., J. Nissen-Meyer, K. Sletten, C. Peláz e I. F. Nes. 1992. Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1985–1990.
- Nigutova, K., M. Morovsky, P. Pristas, R. M. Teather, H. Holo y P. Javorsky. 2007. Production of enterolysin A by rumen *Enterococcus faecalis* strain and occurrence of *enlA* homologues among ruminal Gram-positive cocci. *J. Appl. Microbiol.* 102: 563–569.
- Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* 180: 1848–1854.
- Nilsen, T., I. F. Nes y H. Holo. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2975–2984.
- Nilsson, L., H. H. Huss y L. Gram. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. *Int. J. Food Microbiol.* 38: 217–227.
- Nilsson, L., L. Gram y H. H. Huss. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. *J. Food Prot.* 62: 336–342.
- Nilsson, L., Y. Y. Ng, J. N. Christiansen, B. L. Jørgensen, D. Gróttinun y L. Gram. 2004. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbiol.* 96: 133–143.
- Nissen-Meyer, J. e I. F. Nes. 1997. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167: 67–77.
- Nissen-Meyer, J., H. Holo, L. S. Håvarstein, K. Sletten e I. F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J. Bacteriol.* 174: 5686–5692.
- Novell, J. y M. Raventós. 2003. Producción de mosto cervecero. *Alim. Equip. Tecnol.* mayo: 53–60.
- Núñez, M., J. L. Rodríguez, E. García, P. Gaya y M. Medina. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *J. Appl. Microbiol.* 83: 671–677.
- O'Connor, E. B., B. O'Riordan, S. M. Morgan, H. Whelton, D. M. O'Mullane, R. P. Ross y C. Hill. 2006. A lacticin 3147 enriched food ingredient reduces *Streptococcus mutans* isolated from the human oral cavity in saliva. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1251–1260.

- O’Keeffe, T. y C. Hill.** 2000. Bacteriocins. En: “*Encyclopedia of food microbiology*”, pp. 183–191. Robinson, R. K., C. A. Batt y P. D. Patel (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- O’Keeffe, T., C. Hill y R. P. Ross.** 1999. Characterization and heterologous expression of the genes encoding enterocin A production, immunity, and regulation in *Enterococcus faecium* DPC1146. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1506–1515.
- O’Mahony, A., T. O’Sullivan, Y. Walsh, A. Vaughan, M. Maher, G. F. Fitzgerald y D. van Sinderen.** 2000. Characterization of antimicrobial producing lactic acid bacteria from malted barley. *J. Inst. Brew.* 106: 403–410.
- O’Mahony, T., N. Rekhif, C. Cavadini, y G. F. Fitzgerald.** 2001. The application of a fermented food ingredient containing ‘variacin’, a novel antimicrobial produced by *Kocuria varians*, to control the growth of *Bacillus cereus* in chilled dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 90: 106–114.
- O’Sullivan, L., R. P. Ross y C. Hill.** 2002a. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84: 593–604.
- O’Sullivan, L., S. M. Morgan, R. P. Ross y C. Hill.** 2002b. Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lacticin 481, produced by *Lactococcus lactis* DPC5552. *J. Dairy Sci.* 85: 2130–2140.
- Ogden, K.** 1986. Nisin: a bacteriocin with a potential use in brewing. *J. Inst. Brew.* 92: 379–383.
- Ogden, K. y R. S. Tubb.** 1985. Inhibition of beer spoilage lactic acid bacteria by nisin. *J. Inst. Brew.* 91: 390–392.
- Ogden, K. y M. J. Waites.** 1986. The action of nisin on beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* 92: 463–467.
- Ogden, K., M. J. Waites y J. R. M. Hammond.** 1988. Nisin and brewing. *J. Inst. Brew.* 94: 233–238.
- Ogier, J. -C. y P. Serrero.** 2008. Part VI: The *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* (en prensa).
- Ogier, J. -C., E. Casalta, C. Farrokh y A. Saïhi.** 2008. The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* (en prensa).
- Ohmomo, S., S. Murata, N. Katayama, S. Nitisinprasart, M. Kobayashi, T. Nakajima, M. Yajima y K. Nakanishi.** 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. *J. Appl. Microbiol.* 88: 81–89.
- Ojcius, D. M. y J. D. Young.** 1991. Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem. Sci.* 16: 225–229.
- Olasupo, N. A., U. Schillinger, C. M. A. P. Franz y W. H. Holzapfel.** 1994. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from “wara”-a fermented skimmed cow milk product from west Africa. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 438–441.
- Oliveira, C. C., J. J. van den Heuvel y J. E. McCarthy.** 1993. Inhibition of translational initiation in *Sacharomyces cerevisiae* by secondary structure: the roles of the stability and position of stem-loops in the mRNA leader. *Mol. Microbiol.* 9: 521–532.
- Oliver, R. y F. Estrany.** 2005. La cerveza (y II). Fabricación artesanal de la cerveza. *Alim. Equip. Tecnol.* mayo: 59–62.
- Oppegård, C., P. R. Linda-Emanuelson, P. E. Kristiansen, G. Fimland y J. Nissen-Meyer.** 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 210–219.
- Oumer, A., P. Gaya, E. Fernández-García, R. Marciana, S. Garde, M. Medina y M. Núñez.** 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin-producing adjunct culture. *J. Dairy Res.* 68: 117–129.
- Ouwehand, A. C.** 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: “*Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*”, pp. 139–160, 2ª ed. Salminen, S. y A. von Wright (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.

- Ouwehand, A. C., S. Salminen y E. Isolauri.** 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279–289.
- Pag, U. y H. -G. Sahl.** 2002a. Lanthionine-containing bacterial peptides. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 47–80. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Pag, U. y H. -G. Sahl.** 2002b. Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics? *Curr. Pharm. Des.* 8: 815–833.
- Pantev, A., P. Kabadjova, M. Dalgalarrrondo, T. Haertlé, I. Ivanova, X. Dousset, H. Prévost y J. M. Chobert.** 2002. Isolation and partial characterization of an antibacterial substance produced by *Enterococcus faecium*. *Folia Microbiol. (Praha)* 47: 391–400.
- Papagianni, M.** 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21: 465–499.
- Papamanoli, E., N. Tzanetakis, E. Litopoulou-Tzanetaki y P. Kotzekidou.** 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 65: 859–867.
- Parente, E. y C. Hill.** 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 55: 497–502.
- Parente, E. y A. Ricciardi.** 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 628–638.
- Parente, E., C. Brienza, A. Ricciardi y G. Addario.** 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18: 62–67.
- Parolin, C., A. dal Corso, L. Alberghina, D. Porro y P. Branduardi.** 2005. Heterologous production of five Hepatitis C virus-derived antigens in three *Saccharomyces cerevisiae* host strains. *J. Biotechnol.* 120: 46–58.
- Parret, A. y R. de Mot.** 2000. Novel bacteriocins with predicted tRNase and pore-forming activities in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* 35: 472–473.
- Pavia, M., C. G. Nobile, L. Salpietro e I. F. Angelillo.** 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Prot.* 63: 912–915.
- Peláez, C. y T. Requena.** 2005. Exploiting the potential of bacteria in cheese ecosystem. *Int. Dairy J.* 15: 831–844.
- Pérez-Pulido, R., H. Abriouel, N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martínez-Cañamero y A. Gálvez.** 2006. Safety and potencial risks of enterococci isolated from tradicional fermented capers. *Food Chem. Toxicol.* 44: 2070–2077.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud.** 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71: 525–541.
- Piard, J. C. y M. Desmazeaud.** 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* 72: 113–142.
- Plano, G. V., J. B. Day y F. Ferracci.** 2001. Type III export: new uses for an old pathway. *Mol. Microbiol.* 40: 284–293.
- Poeta, P., D. Costa, J. Rodrigues y C. Torres.** 2006. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Dis.* 50: 64–68.
- Poeta, P., D. Costa, B. Rojo-Bezares, M. Zarazaga, N. Klibi, J. Rodrigues y C. Torres.** 2007. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol. Res.* 162: 257–263.
- Pöhlshroder, M., W. A. Prinz, E. Hartmann y J. Beckwith.** 1997. Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* 91: 563–566.

- Pons, A. -M., I. Lanneluc, G. Cottenceau y S. Sable.** 2002. New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie* 84: 531–537.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters y K. H. Scheleifer.** 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. En: “*Bacteriocins of lactic acid bacteria*”, pp. 14–67. De Vuyst, L. y E. J. Vandamme (eds.). Blackie Academic & Professional, Oxford, Reino Unido.
- Pouwels, P. H., R. J. Leer, M. Shaw, M. -J. H. den Bak-Glashouwer, F. D. Tielen, E. Smit, B. Martínez, J. Jore y P. L. Conway.** 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 155–167.
- Pretorius, I. S.** 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. *Yeast* 16: 675–729.
- Pretorius, I. S. y F. F. Bauer.** 2002. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.* 20: 426–432.
- Priault, G., C. Turcotte, L. Labarre, C. Lacroix e I. Fliss.** 2000. Rapid purification of nisin Z using specific monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Int. Dairy J.* 10: 627–633.
- Psoni, L., C. Kotzamanides, C. Andrighetto, A. Lombardi, N. Tzanetakis y E. Litopoulou-Tzanetaki.** 2006. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 109–120.
- Pugsley, A. P.** 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 50–108.
- Quadri, L. E. N.** 2002. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 133–145.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1994. Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *J. Biol. Chem.* 269: 12204–12211.
- Quadri, L. E. N., M. Sailer, M. R. Terebiznik, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1995. Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *J. Bacteriol.* 177: 1144–1151.
- Quadri, L. E. N., L. Z. Yan, M. E. Stiles y J. C. Vederas.** 1997a. Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. Overproduction of the antimicrobial peptide, its engineered variants, and its precursor in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272: 3384–3388.
- Quadri, L. E. N., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers, W. M. de Vos, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1997b. Characterization of a locus from *Carnobacterium piscicola* LV17B involved in bacteriocin production and immunity: evidence for global inducer-mediated transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 179: 6163–6171.
- Quintavalla, S. y L. Vicini.** 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci.* 62: 373–380.
- Radler, F.** 1990a. Possible use of nisin in winemaking. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 1–6.
- Radler, F.** 1990b. Possible use of nisin in winemaking. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 7–11.
- Rainieri, S., Y. Kodama, Y. Kaneko, K. Mikata, Y. Nakao y T. Ashikari.** 2006. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3968–3974.
- Ramnath, M., M. Beukes, K. Tamura y J. W. Hastings.** 2000. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3098–3101.
- Ramnath, M., S. Arous, A. Gravesen, J. W. Hastings e Y. Héchard.** 2004. Expression of *mptC* of *Listeria monocytogenes* induces sensitivity to class IIa bacteriocins in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 150: 2663–2668.

- Randazzo, C. L., C. Restuccia, D. A. Romano y C. Caggia.** 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *Int. J. Food Microbiol.* 90: 9–14.
- Rasch, M. y S. Knöchel.** 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 275–278.
- Ray, B.** 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as biopreservatives: an overview. En: “*Food biopreservatives of microbial origin*”, pp. 177–205. Ray, B. y M. A. Daeschel (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, EE.UU.
- Ray, B., R. Schamber y K. W. Miller.** 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2281–2286.
- Rayman, M. K., B. Aris y A. Hurst.** 1981. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 375–380.
- Reddy, K. V., C. Aranha, S. M. Gupta y R. D. Yedery.** 2004. Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: in vitro and in vivo studies. *Reproduction* 128: 117–126.
- Reid, F. L., K. A. Ahmed, W. M. Waites y G. S. A. B. Stewart.** 1990. The rapid detection of antimicrobials using bioluminescent lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: P88.
- Rekhif, N., A. Atrih y G. Lefebvre.** 1994. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria strains. *Curr. Microbiol.* 28: 237–241.
- Ribeiro, T., M. Abrantes, M. F. Silva-Lopes y M. T. B. Crespo.** 2007. Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *vanA* and *vanB* genes. *Int. J. Food. Microbiol.* 113: 289–295.
- Richard, C., D. Drider, I. Fliss, S. Denery y H. Prévost.** 2004a. Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 248–254.
- Richard, C., D. Drider, K. Elmorjani, D. Marion y H. Prévost.** 2004b. Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 4276–4284.
- Richard, C., R. Cañon, K. Naghmouchi, D. Bertrand, H. Prévost y D. Drider.** 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food Microbiol.* 23: 175–183.
- Riley, M. A. y J. E. Wertz.** 2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 117–137.
- Rincé, A., A. Dufour, P. Uguen, J.-P. Le Pennec y D. Haras.** 1997. Characterization of the lactacin 481 operon: the *Lactococcus lactis* genes *lctF*, *lctE*, and *lctG* encode a putative ABC transporter involved in bacteriocin immunity. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4252–4260.
- Rinck, M. y K. Wackerbauer.** 1987. Detection and serological classification of lactic acid bacteria, especially *L. lindneri*. *Brauwelt Int.* 2: 181–184.
- Ringø, E., U. Schillinger y W. Holzapfel.** 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. En: “*Microbial Ecology of the Growing Animal, 2*”, pp. 408–443. Holzapfel, W. y P. Naughton (eds.). Elsevier Science Ltd. Publishing, Reino Unido.
- Risøen, P. A., L. S. Håvarstein, D. B. Diep e I. F. Nes.** 1998. Identification of the DNA-binding sites of two response regulators involved in control of bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Gen. Genet.* 259: 224–232.
- Risøen, P. A., M. B. Brurberg, V. G. H. Eijsink e I. F. Nes.** 2000. Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 37: 619–628.
- Robichon, D., E. Gouin, M. Débarbouillé, P. Cossart, Y. Cenatiempo e Y. Héchard.** 1997. The *rpoN* (σ^{54}) gene from *Listeria monocytogenes* is involved in resistance to mesentericin Y105, an antibacterial peptide from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 179: 7591–7594.

- Rodgers, S.** 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends Food Sci. Technol.* 12: 276–284.
- Rodgers, S., K. Kailasapathy, J. Cox y P. Peiris.** 2002. Bacteriocin production by protective cultures. *Food Service Technol.* 2: 59–68.
- Rodríguez, E., J. L. Arques, M. Nuñez, P. Gaya y M. Medina.** 2005. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* 0157: H7 in raw-milk cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3399–3404.
- Rodríguez, J. L., P. Gaya, M. Medina y M. Núñez.** 1997. Bactericidal effect of enterocin 4 on *Listeria monocytogenes* in a model dairy system. *J. Food Prot.* 60: 28–32.
- Rojo-Bezares, B., Y. Sáenz, M. Zarazaga, C. Torres y F. Ruiz-Larrea.** 2007a. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 32–36.
- Rojo-Bezares, B., Y. Sáenz, L. Navarro, M. Zarazaga, F. Ruiz-Larrea y C. Torres.** 2007b. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiol.* 24: 482–491.
- Rose, N. L., P. Sporns y L. M. McMullen.** 1999. Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2238–2242.
- Rose, N. L., P. Sporns y L. M. McMullen.** 2001. Production of antibodies against enterocin B for immunological detection and purification purposes. *Food Agric. Immunol.* 13: 225–239.
- Ross, R. P., M. Galvin, O. McAuliffe, S. M. Morgan, M. P. Ryan, D. P. Twomey, W. J. Meaney y C. Hill.** 1999. Developing applications for lactococcal bacteriocins. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 337–346.
- Ross, R. P., S. Morgan y C. Hill.** 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 3–16.
- Ruiz-Barba, J. L., D. P. Cathcart, P. J. Warner y R. Jiménez-Díaz.** 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2059–2064.
- Rusch, S. L. y D. A. Kendall.** 2007. Oligomeric states of the SecA and SecYEG core components of the bacterial Sec translocon. *Biochim Biophys Acta* 1768: 5–12.
- Russell, J. B y H. C. Mantovani.** 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 347–355.
- Russo, S., R. Berkovitz Siman-Tov y G. Poli.** 1995. Yeasts: from genetics to biotechnology. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 14: 133–157.
- Ryan, M. P., M. C. Rea, C. Hill y R. P. Ross.** 1996. An application in Cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 612–619.
- Ryan, M. P., W. J. Meaney, R. P. Ross y C. Hill.** 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2287–2290.
- Ryan, M. P., J. Flynn, C. Hill, R. P. Ross y W. J. Meaney.** 1999. The natural food grade inhibitor, lacticin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 2625–2631.
- Ryan, M. P., R. P. Ross y C. Hill.** 2001. Strategy for manipulation of cheese flora using combinations of lacticin 3147-producing and -resistant cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2699–2704.
- Ryan, M. P., C. Hill y R. P. Ross.** 2002. Exploitation of lantibiotic peptides for food and medical uses. En: “*Peptide antibiotics. Discovery, modes of action, and applications*”, pp. 193–242. Dutton, C. J., M. A. Haxell, H. A. I. McArthur y R. G. Wax (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö y T. Mattila-Sandholm.** 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.* 84: 197–215.

- Saavedra, L., P. Castellano y F. Sesma.** 2004a. Purification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Methods Mol. Biol.* 268: 331–336.
- Saavedra, L., C. Minahk, A. P. de Ruiz Holgado y F. Sesma.** 2004b. Enhancement of the enterocin CRL35 activity by a synthetic peptide derived from the NH₂-terminal sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2778–2781.
- Sabia, C., G. Manicardi, P. Messi, S. de Niederhäusern y M. Bondi.** 2002. Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 75: 163–170.
- Sabia, C., S. de Niederhausem, P. Messi, G. Manicardi y M. Bondi.** 2003. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages ("cacciatore"). *Int. J. Food Microbiol.* 87: 173–179.
- Sabia, C., P. Messi, S. de Niederhäusern, G. Manicardi y M. Bondi.** 2004. Study of two bacteriocins produced by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus faecalis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 99–105.
- Sablon, E., B. Contreras y E. Vandamme.** 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 68: 21–60.
- Sahl, H.-G. y G. Bierbaum.** 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 41–79.
- Sakamoto, K.** 2002. Beer spoilage bacteria and hop resistance in *Lactobacillus brevis*. Tesis Doctoral. Universidad de Groningen, Países Bajos.
- Sakamoto, K. y W. N. Konings.** 2003. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 89: 105–124.
- Sakamoto, K., A. Margolles, H. W. van Veen y W. N. Konings.** 2001. Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multifrug transporter HorA. *J. Bacteriol.* 183: 5371–5375.
- Salminen, S. y A. von Wright.** 1998. En: "*Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*", 2^a ed. Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Salminen, S., E. Isolauri y E. Salminen.** 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 347–358.
- Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M. de Vos, R. Fondén, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. E. Birkeland y T. Mattila-Sandholm.** 1998. Demonstration of safety of probiotics- a review. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 93–106.
- Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno e Y. K. Lee.** 1999. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* 10: 107–110.
- Salzano, G., F. Villani, O. Pepe, E. Sorrentino, G. Moschetti y G. Coppola.** 1992. Conjugal transfer of plasmid-borne bacteriocin production in *Enterococcus faecalis* 226 NWC. *FEMS Microbiol. Lett.* 78: 1–6.
- Samelis, J., J. Metaxopoulos, M. Vlassi y A. Pappa.** 1998. Stability and safety of traditional Greek salami: a microbiological ecology study. *Int. J. Food Microbiol.* 44: 69–82.
- Samelis, J., A. Kakouri y J. Rementzis.** 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiol.* 17: 329–340.
- Sami, M., H. Yamashita, T. Hirono, H. Kadokura, K. Kitamoto, K. Yoda y M. Yamasaki.** 1997a. Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 1–6.
- Sami, M., H. Yamashita, H. Kadokura, K. Kitamoto, K. Yoda y M. Yamasaki.** 1997b. A new and rapid method for determination of beer-spoilage ability of lactobacilli. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 55: 137–140.

- Sami, M., K. Suzuki, K. Sakamoto, H. Kadokura, K. Kitamoto y K. Yoda.** 1998. A plasmid pRH45 of *Lactobacillus brevis* confers hop resistance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 361–363.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2005. Caracterización bioquímica, genética e inmunológica de la hiracina A (*HirA*) y la enterocina C (*EntC*), producidas por enterococos de origen alimentario. *II Reunión de la Red Española de Bacterias Lácticas*. Oviedo, España.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, M. Martín, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2006. Hygienic and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from Maillard ducks (*Anas platyrhynchos*). *1st International Symposium Food, Veterinary and medical applications of antimicrobial peptides*. Poster, D08. Nantes, Francia.
- Sánchez, J., Diep, D. B., Herranz, C., Nes, I. F., Cintas, L. M. y P. E. Hernández.** 2007a. Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 227–236.
- Sánchez, J., A. Basanta, B. Gómez-Sala, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2007b. Antimicrobial and safety aspects, and biotechnological potential of bacteriocinogenic enterococci isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Int. J. Food. Microbiol.* 117: 295–305.
- Sánchez, J., J. Borrero, B. Gómez-Sala, A. Basanta, C. Herranz, L. M. Cintas y P. E. Hernández.** 2008. Cloning and production of hiracin JM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in heterologous lactic acid bacteria (LAB) and *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2471–2479.
- Sánchez, M. T.** 2006. El sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos en las industrias cerveceras. *Alim. Equip. Tecnol.* mayo: 48–57.
- Sánchez-Hidalgo, M., M. Maqueda, A. Gálvez, H. Abriouel, E. Valdivia y M. Martínez-Bueno.** 2003. The genes coding for enterocin EJ97 production by *Enterococcus faecalis* EJ97 are located on a conjugative plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1633–1641.
- Sanchís, V., M. Orive y A. J. Ramos.** 2000. La cerveza: aspectos microbiológicos. Universidad de Lleida, España.
- Sarantinopoulos, P., C. Andrighetto, M. D. Georgalaki, M. C. Rea, A. Lombardi, T. M. Cogan, G. Kalantzopoulos y E. Tsakalidou.** 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.* 11: 621–647.
- Sarantinopoulos, P., F. Leroy, E. Leontopoulou, M. D. Georgalaki, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou y L. de Vuyst.** 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 125–136.
- Satokari, R., R. Juvonen, A. von Wright y A. Haikara.** 1997. Detection of *Pectinatus* beer spoilage bacteria by using the polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 60: 1571–1573.
- Satokari, R., R. Juvonen, K. Mallison, A. von Wright y A. Haikara.** 1998. Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 45: 119–127.
- Saucier, L., A. S. Paradkar, L. S. Frost, S. E. Jensen y M. E. Stiles.** 1997. Transcriptional analysis and regulation of carnobacteriocin production in *Carnobacterium piscicola* LV17. *Gene* 188: 271–277.
- Scannell, A. G. M., R. P. Ross, C. Hill y E. K. Arendt.** 2000a. An effective lacticin biopreservative in fresh pork sausage. *J. Food Prot.* 63: 370–375.
- Scannell, A. G. M., C. Hill, R. P. Ross, S. Marx, W. Hartmeier y E. K. Arendt.** 2000b. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins lacticin 3147 and nisaplin®. *Int. J. Food Microbiol.* 60: 241–249.
- Schägger, H. y G. von Jagow.** 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368–379.

- Schiffer, M., C. -H. Chang y F. J. Stevens.** 1992. The function of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng.* 5: 213–214.
- Schleifer, K. H. y R. Kilpper-Bälz.** 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 31–34.
- Schillinger, U. y F. K. Lücke.** 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ. Microbiol.* 55: 1901–1906.
- Schillinger, U., M. Kaya y F. K. Lucke.** 1991. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 473–478.
- Schillinger, U., R. Geisen y W. H. Holzapfel.** 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158–164.
- Schneider, E. y S. Hunke.** 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 1–20.
- Schoeman, H., M. A. Vivier, M. du Toit, L. M. T. Dicks e I. S. Pretorius.** 1999. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 647–656.
- Schuller, D. y M. Casal.** 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 292–304.
- Schuster, M., A. Einhauer, E. Wasserbauer, F. Süßenbacher, C. Ortner, M. Paumann, G. Werner y A. Jungbauer.** 2000. Protein expression in yeast; comparison of two expression strategies regarding protein maturation. *J. Biotechnol.* 84: 237–248.
- Sebban-Kreuzer, C., P. Deprez-Beauclair, A. Berton e I. Crenon.** 2006. High-level expression of nonglycosylated human pancreatic lipase-related protein 2 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 49: 284–291.
- Sendra, J. M. y J. V. Carbonell.** 1999. Calidad sanitaria de la cerveza. En: “*Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas*”, pp. 23–33. Centro de Información Cerveza y Salud, Madrid, España.
- Settanni, L. y A. Corsetti.** 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 121: 123–138.
- Settanni, L., O. Massitti, D. Van Sinderen y A. Corsetti.** 2005. *In situ* activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 99: 670–681.
- Shankar, N., P. Coburn, C. Pillar, W. Haas y M. Gilmore.** 2004. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 609–618.
- Shortt, C.** 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 411–417.
- Sianidis, G., S. Karamanou, E. Vrontou, K. Boulias, K. Repanas, N. Kyrpides, A. S. Politou y A. Economou.** 2001. Cross-talk between catalytic and regulatory elements in a DEAD motor domain is essential for SecA function. *EMBO J.* 20: 961–970.
- Siezen, R. J., O. P. Kuipers y W. M. de Vos.** 1996. Comparison of the lantibiotic gene clusters and encoded proteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 69: 171–184.
- Silkin, L., S. Hamza, S. Kaufman, S. L. Cobb y J. C. Vederas.** 2008. Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilisin A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (en prensa).
- Silva-Lopes, M. F., T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo-Marques, R. Tenreiro y M. T. Barreto-Crespo.** 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 191–198.

- Simonetta, A. C., L. G. Moraques de Velasco y L. N. Frisón.** 1997. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 139–143.
- Simonová, M. y A. Lauková.** 2007. Bacteriocin activity of enterococci from rabbits. *Vet. Res. Commun* 31: 143–152.
- Simpson, W. J.** 1993a. Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1041–1045.
- Simpson, W. J.** 1993b. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *J. Inst. Brew.* 99: 405–411.
- Simpson, W. J. y J. L. Fernandez.** 1992. Selection of beer spoilage lactic acid bacteria and induction of their ability to grow in beer. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 13–16.
- Siragusa, G. R.** 1992. Production of bacteriocin inhibitory to *Listeria* species by *Enterococcus hirae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3508–3513.
- Siragusa, G. R., C. N. Cutter y J. L. Willett.** 1999. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.* 16: 229–235.
- Skaugen, M., L. M. Cintas e I. F. Nes.** 2003. Genetics of bacteriocin production in lactic acid bacteria. En: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 225–260. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, EE.UU.
- Smit, G., B. A. Smit y W. J. M. Engels.** 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 591–610.
- Sobrinho, O. J.** 1993. Caracterización parcial, bioquímica e inmunológica, de una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus sake* 148. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España.
- Sørensen, K. I., R. Larsen, A. Kibenich, M. P. Junge y E. Johansen.** 2000. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1253–1258.
- Sparo, M. D., M. S. Castro, P. J. Andino, M. V. Lavigne, C. Ceriani, G. L. Gutiérrez, M. M. Fernández, M. C. de Marzi, E. L. Malchiodi y M. A. Manghi.** 2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* 100: 123–134.
- Sprules, T., K. E. Kawulka y J. C. Vederas.** 2004. NMR solution structure of ImB2, a protein conferring immunity to antimicrobial activity of the type IIa bacteriocin, carnobacteriocin B2. *Biochemistry* 43: 11740–11749.
- Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship, J. T. Tsay, P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam y L. A. Birkenberger.** 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190: 55–62.
- Stein, T., S. Heinzmann, S. Düsterhus, S. Borchert y K.-D. Entian.** 2005. Expression and functional analysis of the subtilin immunity genes spaIFEG in the subtilin-sensitive host *Bacillus subtilis* MO1099. *J. Bacteriol.* 187: 822–828.
- Steinkraus, K. H.** 1982. Fermented foods and beverages: the role of mixed cultures. En: “*Microbial Interactions and Communities*”, pp. 407–442. Bull, A. T. y S. H. Sluter (Eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Steinkraus, K. H.** 2002. Fermentations in world food processing. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1: 23–32.
- Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes y T. R. Klaenhammer.** 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613–3615.
- Stiles, M. E.** 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70: 331–345.
- Stiles, M. E. y J. W. Hastings.** 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* 2: 247–251.
- Stiles, M. E. y W. H. Holzapfel.** 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1–29.

- Storgards, E., M. L. Suihko, B. Pot, K. Vanhonacker, D. Janssens, P. L. E. Broomfield y J. G. Banks. 1998. Detection and identification of *Lactobacillus lindneri* from brewery environments. *J. Inst. Brew.* 104: 47–53.
- Straume, D., M. Kjos, I. F. Nes y D. B. Diep. 2007. Quorum-sensing based bacteriocin production is down-regulated by N-terminally truncated species of gene activators. *Mol. Genet. Genomics* 278: 283–293.
- Stringer, S. C., C. E. R. Dodd, M. R. A. Morgan y W. M. Waites. 1995. Locating nisin-producing *Lactococcus lactis* in a fermented meat system. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 341–348.
- Suárez, A. M., J. M. Rodríguez, P. E. Hernández y J. I. Azcona-Olivera. 1996a. Generation of polyclonal antibodies against nisin: immunization strategies and immunoassay development. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2117–2121.
- Suárez, A. M., J. M. Rodríguez, P. Morales, P. E. Hernández y J. I. Azcona-Olivera. 1996b. Development of monoclonal antibodies to the lantibiotic nisin A. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2936–2940.
- Suárez, A. M., J. I. Azcona, J. M. Rodríguez, B. Sanz y P. E. Hernández. 1997. One-step purification of nisin A by immunoaffinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4990–4992.
- Suzuki, K., M. Sami, H. Kadokura, H. Nakajima y K. Kitamoto. 2002. Biochemical characterization of *horA*-independent hop resistance mechanism in *Lactobacillus brevis*. *Int. J. Food Microbiol.* 76: 223–230.
- Suzuki, K., M. Koyanagi y H. Yamashita. 2004. Genetic characterization of non-spoilage variant isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45^C. *J. Appl. Microbiol.* 96: 946–953.
- Suzuki, K., M. Sami, K. Ozaki y H. Yamamita. 2005a. Comparative study of two plasmids, pRH45 and pRH 20690, isolated from beer-spoilage *Lactobacillus brevis* ABBC45 and *Lactobacillus lindneri* DSM20690. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 63: 11–16.
- Suzuki, K., K. Iijima, K. Ozaki y H. Yamashita. 2005b. Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5089–5097.
- Suzuki, K., K. Iijima, K. Sakamoto, M. Sami y H. Yamashita. 2006. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *J. Inst. Brew.* 112: 173–191.
- Suzuki, K., S. Asano, K. Iijima, H. Kuriyama e Y. Kitagawa. 2008. Development of detection medium for hard-to-culture beer-spoilage lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1458–1470.
- Suzzi, G. y F. Gardini. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 41–54.
- Švec, P., L. A. Devriese, I. Sedláček, M. Baele, M. Vancanneyt, F. Haesebrouck, J. Swings y J. Doškař. 2001. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1567–1574.
- Švec, P., A. Ševčíková, I. Sedláček, J. Bednářová, C. Snauwaert, K. Lefebvre, P. Vandamme y M. Vancanneyt. 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from human blood cultures. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49: 192–196.
- Swe, P. M., N. C. K. Heng, Y.-T. Ting, H. J. Baird, A. Carne, A. Tauch, J. R. Tagg y R. W. Jack. 2007. *efl097* and *ypkK* encode enterococcin V583 and corynicin JK, members of a new family of antimicrobial proteins (bacteriocins) with modular structure from Gram-positive bacteria. *Microbiol.* 153: 3218–3227.
- Tagg, J. R. 2004. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J. Med. Res.* 119: 13–16.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani y L.W. Wanamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722–756.
- Taguchi, H., T. Yasui y T. Kamiya. 1995. An improved discrimination method of beer spoilage lactobacilli. En: “European Brewery Convention: Proceedings of the 25th Congress”, pp. 616–628. Oxford, University Press, Reino Unido.

- Takahashi, T., Y. Nakakita, J. Watari y K. Shinotsuka.** 2000. Application of a bioluminescence method for the beer industry: sensitivity of MicroStarTM-RMDS for detecting beer-spoilage bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1032–1037.
- Takala, T. M. y P. E. Saris.** 2002. A food-grade cloning vector for lactic acid bacteria based on the nisin immunity gene *nisI*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 467–471.
- Tamine, A. Y.** 2002. Microbiology of starter cultures. En: “*Dairy Microbiology Handbook*”, 3^a ed. Robinson, R. K. (ed.). Wiley Interscience, Inc., Nueva York, EE.UU.
- Tannock, G. W. y G. Cook.** 2002. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. En “*The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, antibiotic resistance, and infection control*”, pp. 101–132. Gilmore, M. S., D. B. Clewell, P. M. Courvalin, G. M. Dunne, B. E. Murray y L. B. Rice (eds.). ASM Press, Washington D.C., EE.UU.
- Taylor, S. L., E. B. Somers y L. A. Krueger.** 1985. Antibotulinal effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. *J. Food Prot.* 48: 234–239.
- Temmerman, R., B. Pot, G. Huys y J. Swings.** 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 1–10.
- Ten Brink, B., M. Minekus, J. M. van der Vossen, R. J. Leer y J. H. Huis in't Veld.** 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 140–148.
- Thelen, K., C. Beimfohr y J. Snidr.** 2004. VIT-Bier: the rapid and easy detection method for beer-spoiling bacteria. *Tech. q. – Master Brew. Assoc. Am.* 41: 115–119.
- Theppangna, W., T. Murase, N. Tokumaru, H. Chikumi, E. Shimizu y K. Otsuki.** 2007. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 1235–1239.
- Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel y W. P. Hammes.** 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 460–468.
- Tichaczek, P. S., R. F. Vogel y W. P. Hammes.** 1994. Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. *Microbiology* 140: 361–367.
- Todokoro, D., H. Tomita, T. Inoue e Y. Ike.** 2006. Genetic analysis of bacteriocin 43 of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6955–6964.
- Todorov, S. D. y L. M. T. Dicks.** 2004. Screening of lactic-acid bacteria from South African barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. *Folia Microbiol.* 49: 406–410.
- Todorov, S. D. y L. M. T. Dicks.** 2005. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *J. Basic Microbiol.* 45: 312–322.
- Todorov, S. D., M. B. Wachsman, H. Knoetze, M. Meincken y L. M. T. Dicks.** 2005. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25: 508–513.
- Tomita, H. e Y. Ike.** 2005. Bacteriocin 41 encoded on *E. faecalis* pheromone-responsive plasmid pYI14 (61 kb) and the extracellular complementary components for the bacteriocin activity. 2nd International ASM-FEMS Conference on Enterococci. Poster B78. Helsingør, Dinamarca.
- Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto e Y. Ike.** 1997. Cloning and genetic and sequence analysis of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* 179: 7843–7855.
- Tompkins, T. A., R. Stewart, L. Savard, I. Russell y T. M. Dowhanick.** 1996. RAPD-PCR characterization of brewery yeast and beer spoilage bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54: 91–96.

- Torri Tarelli, G., D. Carminati y G. Giraffa.** 1994. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from dairy enterococci. *Food Microbiol.* 11: 243–252.
- Trautner, B. W., R. A. Hull y R. O. Darouiche.** 2005. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 413–415.
- Trucksis, M., T. L. Conn, A. Fasano y J. B. Kaper.** 1997. Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*. *Infect. Immun.* 65: 4984–4988.
- Tsai, C. -C., L. -F. Huang, C. -C. Lin y H. -Y. Tsen.** 2004. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strain of *Enterococcus faecium* TM39. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 1–12.
- Tsuchiya, Y., Y. Kano y S. Koshino.** 1994. Identification of lactic acid bacteria using temperature gradient gel electrophoresis for DNA fragments amplified by polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 52: 95–99.
- Tsuchiya, Y., Y. Nakakita, J. Watari y K. Shinotsuka.** 2000. Monoclonal antibodies specific for the beer-spoilage ability of lactic acid bacteria. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58: 89–93.
- Tsuchiya, Y., K. Morioka, J. Shirai, Y. Yokomizo y K. Yoshida.** 2003. Gene design of signal sequence for effective secretion of protein. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 3: 261–262.
- Twomey, D. P., A. I. Wheelock, J. Flynn, W. J. Meaney, C. Hill y R. P. Ross.** 2000. Protection against *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cows using a bismuth-based teat seal containing the bacteriocin, lactacin 3147. *J. Dairy Sci.* 83: 1981–1988.
- Twomey, D., R. P. Ross, M. Ryan, B. Meaney y C. Hill.** 2002. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 165–185.
- Työppönen, S., E. Petäjä y T. Mattila-Sandholm.** 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83: 233–244.
- Uguen, P., J. Hamelin, J. P. Le Pennec y C. Blanco.** 1999. Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 291–293.
- Uhart, M., S. Ravishankar y N. D. Maks.** 2004. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4 degrees C. *J. Food Prot.* 67: 2296–2301.
- Uljas, H. y J. B. Luchansky.** 1995. Characterization of bacteriocins produced by lactobacilli and their use to control calcium lactate crystalforming lactic acid bacteria in Cheddar cheese. Tesis Doctoral. University of Wisconsin-Madison, Madison, EE.UU.
- Uteng, M., H. H. Hauge, P. R. L. Markwick, G. Fimland, D. Mantzilas, J. Nissen-Meyer y C. Muhle-Goll.** 2003. Three-dimensional structure in lipid micelles of the pediocin-like antimicrobial peptide sakacin P and a sakacin P variant that is structurally stabilized by an inserted C-terminal disulfide bridge. *Biochemistry* 42: 11417–11426.
- Vadyvaloo, V., J. W. Hastings, M. J. van der Merwe y M. Rautenbach.** 2002. Membranes of class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* cells contain increased levels of desaturated and short-acyl-chain phosphatidylglycerols. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5223–5230.
- Vadyvaloo, V., J. L. Snoep, J. W. Hastings y M. Rautenbach.** 2004a. Physiological implication of class IIa bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150: 335–340.
- Vadyvaloo, V., S. Arous, A. Gravesen, Y. Hechard, R. Chauchan-Haubrock, J. W. Hastings y M. Rautenbach.** 2004b. Cell-surface alterations in class IIa bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* strains. *Microbiology* 150: 3025–3033.
- Vahjen, W., D. Taras y O. Simon.** 2007. Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.* 8: 1–8.
- Van Belkum, M. J. y M. E. Stiles.** 1995. Molecular characterization of genes involved in the production of the bacteriocin leucocin A from *Leuconostoc gelidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3573–3579.

- Van Belkum, M. J., J. Kok, G. Venema, H. Holo, I. F. Nes, W. N. Konings y T. Abee.** 1991. The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein-mediated manner. *J. Bacteriol.* 173: 7934–7941.
- Van Belkum, M. J., J. Kok y G. Venema.** 1992. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 572–579.
- Van den Berghe, E., T. de Winter y L. de Vuyst.** 2006. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutriente depletion. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 159–170.
- Van Reenen, C. A., L. M. T. Dicks y M. L. Chikindas.** 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 84: 1131–1137.
- Van Reenen, C. A., M. L. Chikindas, W. H. van Zyl y L. M. T. Dicks.** 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 29–40.
- Van Veen, H. W., K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, A. J. M. Driessen y W. N. Konings.** 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10668–10672.
- Van Wely, K. H. M., J. Swaving, R. Freudl y A. J. M. Driessen.** 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 437–454.
- Vancanneyt, M., A. Lombardi, C. Andrighetto, E. Knijff, S. Torriani, K. J. Bjorkroth, C. M. A. P. Franz, M. R. Foulquie-Moreno, H. Revets, L. de Vuyst, J. Swings, K. Kersters, F. Dellaglio y W. H. Holzapfel.** 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1381–1391.
- Vandenbergh, P. A.** 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 221–238.
- Varella-Coelho, M. L., J. dos Santos-Nascimento, P. C. Fagundes, D. J. Madureira, S. S. Oliveira, M. A. Vasconcelos y M. C. F. Bastos.** 2007. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res. Microbiol.* 158: 625–630.
- Varnam, A. H. y J. P. Sutherland.** 1997. Bebidas alcohólicas: I. Cerveza. En: “*Bebidas. Tecnología, química y microbiología*”, pp. 307–365. Ena, J. M. (ed.). Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Vaughan, A., V. G. H. Eijssink, T. F. O’Sullivan, K. O’Hanlon y D. van Sinderen.** 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. *J. Appl. Microbiol.* 91: 131–138.
- Vaughan, A., V. G. H. Eijssink y D. van Sinderen.** 2003. Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7194–7203.
- Vaughan, A., S. Rouse y D. van Sinderen.** 2004. Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. *J. Inst. Brew.* 110: 181–188.
- Vaughan, A., T. O’Sullivan y D. van Sinderen.** 2005. Enhancing the microbiological stability of malt and beer - a review. *J. Inst. Brew.* 111: 355–371.
- Vega-Laso, M. R., D. Zhu, F. Sagliocco, A. J. Brown, M. F. Tuite y J. E. McCarthy.** 1993. Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J. Biol. Chem.* 268: 6453–6462.
- Venema, K., R. E. Haverkort, T. Abee, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, L. de Leij, G. Venema y J. Kok.** 1994. Mode of action of LciA, the lactococcin A immunity protein. *Mol. Microbiol.* 14: 521–532.
- Venema, K., M. L. Chikindas, J. F. M. I. Seegers, A. J. Haandrikman, K. J. Leenhouts, G. Venema y J. Kok.** 1997. Rapid and efficient purification method for small, hydrophobic, cationic bacteriocins: purification of lactococcin B and pediocin PA-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 305–309.

- Vermeiren, L., F. Devlieghere y J. Debevere.** 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 149–164.
- Vescovo, M., C. Orsi, G. Scolari y S. Torriani.** 1995. Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on microflora associated with ready-to-use vegetables. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 121–125.
- Vignolo, G., S. Fadda, M. N. de Kairuz, A. A. de Ruiz Holgado y G. Oliver.** 1996. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 397–402.
- Vignolo, G., J. Palacios, M. E. Farías, F. Sesma, U. Schillinger, W. Holzapfel y G. Oliver.** 2000. Combined effect of bacteriocins on the survival of various *Listeria* species in broth and meat system. *Curr. Microbiol.* 41: 410–416.
- Villani, F., G. Salzano, E. Sorrentino, O. Pepe, P. Marino y S. Coppola.** 1993. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 380–387.
- Villate, F., A. S. Hussein, T. T. Bachmann y R. D. Schmid.** 2001. Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 463–465.
- Vogel, R. F., B. S. Pohle, P. S. Tichaczek y W. P. Hammes.** 1993. The competitive advantage of *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in sausage fermentations is caused by formation of curvacin A. *System. Appl. Microbiol.* 16: 457–462.
- Von Mollendorff, J. W., S. D. Todorov y L. M. T. Dicks.** 2007. Factors affecting the adsorption of bacteriocins to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142: 209–220.
- Wachsman, M. B., V. Castilla, A. P. de Ruiz Holgado, R. A. de Torres, F. Sesma y C. E. Coto.** 2003. Enterocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Res.* 58: 17–24.
- Wahlström, G. y P. E. J. Saris.** 1999. A nisin bioassay based on bioluminescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3742–3745.
- Wallace, T. D., S. Bradley, N. D. Buckley y J. M. Green-Johnson.** 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J. Food Prot.* 66: 466–472.
- Wan, J., K. Harmark, B. E. Davidson, A. J. Hillier, J. B. Gordon, A. Wilcock, M. W. Hickey y M. J. Coventry.** 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscicolin 126 in milk and Camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *J. Appl. Microbiol.* 82: 273–280.
- Wandersman, C.** 1992. Secretion across the bacterial outer membrane. *Trends Genet.* 8: 317–322.
- Wandersman, C.** 1998. Protein and peptide secretion by ABC exporters. *Res. Microbiol.* 149: 163–170.
- Wang, C. -Y. C., H. -S. Shie, S. -C. Chen, J. -P. Huang, I. -C. Hsieh, M. -S. Wen, F. -C. Lin y D. Wu.** 2007. *Lactococcus garvieae* infections in humans: possible association with aquaculture outbreaks. *Int. J. Clin. Pract.* 61: 68–73.
- Wang, Y., M. E. Henz, N. L. F. Gallagher, S. Chai, A. C. Gibbs, Z. Y. Liang, M. E. Stiles, D. S. Wishart y J. C. Vederas.** 1999. Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry* 38: 15438–15447.
- Ward, B.** 1999. Meeting preview: delivering the goods. *Microbiol. Today* 26: 74–76.
- Wegener, H. C., F. M. Aarestrup, L. B. Jensen, A. M. Hammerum y F. Bager.** 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 329–335.
- Weissbach, H., F. Etienne, T. Hoshi, S. H. Heinemann, W. T. Lowther, B. Matthews, G. St John, C. Nathan y N. Brot.** 2002. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 172–178.

- Wells, J. M. y A. Mercenier.** 2003. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vehicles. En: “*Genetics of lactic acid bacteria*”, pp. 261–315. Wood, B. J. B. y P. J. Warner (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York, EE.UU.
- Witte, W., R. Wirth e I. Klare.** 1999. Enterococci. *Chemotherapy* 45: 135–145.
- Wood, B. J. B.** 1998. En: “*Microbiology of fermented foods, vol. 1 and 2*”, 2ª ed. Wood, B. J. B. (ed.). Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido.
- Worobo, R. W., T. Henkel, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1994. Characteristics and genetic determinant of a hydrophobic peptide bacteriocin, carnobacteriocin A, produced by *Carnobacterium piscicola* LV17A. *Microbiology* 140: 517–526.
- Worobo, R. W., M. J. van Belkum, M. Sailer, K. L. Roy, J. C. Vederas y M. E. Stiles.** 1995. A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. *J. Bacteriol.* 177: 3143–3149.
- Xue, J., I. Hunter, T. Steinmetz, A. Peters, B. Ray y K. W. Miller.** 2005. Novel activator of mannose-specific phosphotransferase system permease expression in *Listeria innocua*, identified by screening for pediocin ACh resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1283–1290.
- Yamamoto, Y., Y. Togawa, M. Shimosaka y M. Okazaki.** 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* strain RJ11. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5746–5753.
- Yamazaki, K., M. Suzuki, Y. Kawai, N. Inoue y T. J. Montville.** 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *J. Food Prot.* 66: 1420–1425.
- Yanagida, F., Y. Chen, T. Onda y T. Shinohara.** 2005. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 40: 430–435.
- Yang, R., M. C. Johnson y B. Ray.** 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3355–3359.
- Yasui, H., K. Shida, T. Matsuzaki y T. Yokokura.** 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 383–389.
- Yasui, T. y K. Yoda.** 1997a. The group E antigen is masked by the paracrystalline surface layer in *Lactobacillus brevis*. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 35–40.
- Yasui, T. y K. Yoda.** 1997b. Imaging of *Lactobacillus brevis* single cells and microcolonies without a microscope by an ultrasensitive chemiluminescent enzyme immunoassay with a photon-counting television camera. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4528–4533.
- Yasui, T., H. Taguchi y T. Kamiya.** 1992. Method of group antigen exposure to the cell surface for rapid detection of *Lactobacillus brevis* using enzyme immunoassay. *Proc. Inst. Brew.* 22: 190–192.
- Yasui, T., K. Yoda y T. Kamiya.** 1995. Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 133: 181–186.
- Yasui, T., T. Okamoto y H. Taguchi.** 1997. A specific oligonucleotide primer for the rapid detection of *Lactobacillus lindneri* by polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 43: 157–163.
- Yermolenko, E., A. Chernish, G. Aleshina, E. Cvetkova, I. Martsinkovsya, V. Kolodjieva y S. Suvorov.** 2006. Antagonistic activity of *Enterococcus faecium* L3 against different groups of pathogenic streptococci. *Int. Congr. Ser.* 1289: 363–366.
- Yoon, Y. C., H. J. Park, N.-K. Lee y H.-D. Paik.** 2005. Characterization and enhanced production of enterocin HJ35 by *Enterococcus faecium* HJ35 isolated from human skin. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 296–303.
- Young, J. e I. B. Holland.** 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 177–200.
- Yousif, N. M. K., P. Dawyndt, H. Abriouel, A. Wijaya, U. Schillinger, M. Vancanneyt, J. Swings, H. A. Dirar, W. H. Holzapfel y C. M. A. P. Franz.** 2005. Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from “Hussuwa”, an African fermented sorghum product. *J. Appl. Microbiol.* 98: 216–228.

- Zasloff, M.** 1987. Magainins. a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5449–5453.
- Zendo, T., N. Eungruttanagorn, S. Fujioka, Y. Tashiro, K. Nomura, Y. Sera, G. Kobayashi, J. Nakayama, A. Ishizaki y K. Sonomoto.** 2005. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J. Appl. Microbiol.* 99: 1181–1190.
- Zendo, T., J. Nakayama, K. Fujita y K. Sonomoto.** 2007. Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *J. Appl. Microbiol.* 104: 499–507.
- Zhang, H., S. Yoshida, T. Aizawa, R. Murakami, M. Suzuki, N. Koganezawa, A. Matsuura, M. Miyazawa, K. Kawano, K. Nitta e Y. Kato.** 2000. In vitro antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2701–2705.
- Zhao, T., M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. O. E. Mueller y A. H. Parks.** 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 36: 641–647.
- Zottola, E. A., T. L. Yezzi, D. B. Ajao y R. F. Roberts.** 1994. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 227–238.

APÉNDICES

Listado de abreviaturas

Código genético

**Listado de enzimas de restricción y secuencias diana
específicas**

Glosario

Listado de tablas

Listado de figuras

APÉNDICE 1. LISTADO DE ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS GENERALES

A_x	Absorbancia o densidad óptica a una longitud de onda "x"
aa	Aminoácido(s)
ABC	Transportador del tipo ABC (del inglés <i>ATP Binding Cassette</i>)
ABTS	Reactivo ABTS (del inglés <i>2,2'-Azino-bis [3-ethylBenzThiazoline-6-Sulfonic acid]</i>)
Ace	Adhesina Ace o adhesina del colágeno (del inglés <i>Adhesin of Collagen from E. faecalis</i>)
ACE	Enzima de conversión de la angiotensina (del inglés <i>Angiotensin Converting Enzyme</i>)
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADT/TDA	Prueba de difusión en agar (del inglés <i>Agar Diffusion Test</i>)
AG	Aparato de Golgi
Amp	Ampicilina
APCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
ARE	Enterococos resistentes a antibióticos (del inglés <i>Antibiotic Resistant Enterococci</i>)
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	Molécula de ARN mensajero
ARNr	Molécula de ARN ribosómico
ARNt	Molécula de ARN transferente
AS	Adhesina AS o sustancia de agregación (del inglés <i>Aggregation Substance</i>)
ATP	Nucleótido adenosina trifosfato (del inglés <i>Adenosine Tri-Phosphate</i>)
ATPasa	Enzima/proteína con actividad ATPasa
Aur	Aureocina
Bav	Bavaricina
BMM	Medio de cultivo mínimo para <i>Pichia pastoris</i>
BMMY	Medio de cultivo complejo para <i>Pc. pastoris</i>
C-	Grupo carboxilo
CB	Del inglés <i>Coating Buffer</i>
Cbn	Carnobacteriocina
Cir	Circularina
CNS	Estafilococos coagulasa-negativos (del inglés <i>Coagulase Negative Staphylococci</i>)
Col	Colicina
CS	Sobrenadante concentrado
Cur	Curvacina
Cyl	Citolisina o hemolisina β/bacteriocina
DEFT	Técnica de epifluorescencia directa sobre filtro (del inglés <i>Direct Epifluorescent Filter Technique</i>)
Div	Divergicina
DO_x/OD_x	Densidad óptica o absorbancia a una longitud de onda "x"
DTS	Sistema de transporte dedicado (del inglés <i>Dedicated Transport System</i>)
EBS	Sustancia de unión enterococal (del inglés <i>Enterococal Binding Substance</i>)
EII_t^{Man}	Sistema fosfotransferasa (PTS) manosa-específico
EII^{Bgl}	Sistema fosfotransferasa (PTS) glucósido-específico

ELISA	Ensayo inmunoenzimático tipo ELISA (del inglés <i>Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay</i>)
ELISA-NCI	Ensayo ELISA de tipo no competitivo e indirecto
Enl	Enterolisina
Ent	Enterocina
Esp	Adhesina Esp o proteína extracelular superficial (del inglés <i>Extracellular Surface Protein</i>)
FIA	Análisis de inyección del flujo (del inglés, <i>Flow Injection Analysis</i>)
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas (del inglés <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
GAP	Promotor GAP (del inglés <i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
Gas	Gassericina
GRAS	Reconocido generalmente como seguro (del inglés <i>Generally Recognized as Safe</i>)
GRAVY	Grado de hidrofobicidad de una proteína (del inglés <i>Grand Average of Hydropathicity</i>)
GYECC	Medio de cultivo GYECC (del inglés <i>Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate</i>)
G+C	Contenido de bases guanina y citosina (mol%)
HLP	Medio de cultivo HLP (del inglés <i>Hsu's Lactobacillus and Pediococcus Medium</i>)
HPK	Proteína HPK o proteína histidín-quinasa (del inglés <i>Histidin Protein Kinase</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IDF	Del inglés <i>International Dairy Federation</i>
IP	Péptido o factor inductor (del inglés <i>Induction Peptide</i>)
Kan	Kanamicina
LAB	Bacterias lácticas (del inglés <i>Lactic Acid Bacteria</i>)
Las	Lactocina S
LB	Medio de cultivo LB o Luria-Bertani
Lci	Lactococcina
Leu	Leucocina
Lta	Lactacina
Ltn	Lacticina
LWYM	Medio de cultivo LWYM (del inglés <i>Lin's Wild Yeast Medium</i>)
MALDI-TOF-MS	Análisis mediante espectrometría de masas
MCS/CDW	Masa celular seca (del inglés <i>Cell Dry Weight</i>)
MDR	Transportador del tipo MDR o de resistencia a múltiples antibióticos (del inglés <i>Multidrug Resistance</i>)
Mes	Mesentericina
Met	Metionina
MFα1_s	Feromona factor α 1 (del inglés, <i>Mating Pheromone α-factor 1 Secretion Signal</i>)
M_M	Masa molecular
MMCF	Técnica de fluorescencia de microcolonias sobre filtros de membrana (del inglés <i>Membrane Filter Microcolony Fluorescence Method</i>)
MPA	Ensayo en placas microtituladoras (del inglés <i>Mitrotiter Plate Assay</i>)
MRS	Medio de cultivo MRS (del inglés <i>Man, Rogosa and Sharpe</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la metilicina (del inglés <i>Methillicin Resistant Staphylococcus aureus</i>)
MYGP	Medio de cultivo MYGP

m/vol	Relación masa/volumen
N-	Grupo amino
NBB	Medio de cultivo NBB (del alemán <i>Nährboden für Bierschädlingen Bakterien</i>)
NBS	Región de unión a nucleótidos (del inglés <i>Nucleotide-Binding Sites</i>)
NICE	Sistemas de expresión controlados por la nisina A (del inglés <i>Nisin Controlled Expression</i>)
Nis	Nisina
NSLAB	Flora NSLAB o flora láctica que no forma parte del cultivo iniciador (del inglés <i>Non-Starter Lactic Acid Bacteria</i>)
orf	Gen hipotético o marco de lectura abierto (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)
ORF	Proteína hipotética codificada por un <i>orf</i>
PA	Proteína accesoria
pCIZ1+/-	Cepa portadora (+) o no (-) del plásmido pCIZ1
pCIZ2+/-	Cepa portadora (+) o no (-) del plásmido pCIZ2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
Ped	Pediocina
pI	Punto isoeléctrico
Plt	Plantaricina
PME	Proteína de membrana externa de las bacterias Gram-negativas
PMF	Fuerza protón-motriz (del inglés <i>Proton Motive Force</i>)
Psc	Piscicolina
PTS	Sistema PTS o sistema fosfotransferasa (del inglés <i>PhosphoTransferase System</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (del inglés <i>PolyVinylidene DiFluoride</i>)
QPS	Reconocido generalmente como seguro (del inglés <i>Qualified Presumption of Safety</i>)
RE	Reticulo endoplasmático
RND	Superfamilia de reguladores y de proteínas de membrana (del inglés, <i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>)
RR	Proteína RR o proteína reguladora de respuesta (del inglés <i>Response Regulator</i>)
Sak	Sakacina
SC	Medio de cultivo mínimo para el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCGR	Medio de cultivo SC suplementado con galactosa y rafinosa
SDM	Medio de cultivo SDM (del inglés <i>Schwarz Differential Medium</i>)
Sec	Sistema Sec-dependiente o Ruta General de Secreción
SMMP	Medio de cultivo SMMP (del inglés <i>Selective Medium for Megasphaera and Pectinatus</i>)
SOAT	TISP o técnica de inhibición por siembra en picadura (del inglés <i>Stab-On-Agar Test</i>)
SOS	Respuesta SOS o sistema de reparación de membrana
SP	Péptido señal (del inglés <i>Signal Peptide</i>)
SPAT	Técnica de gota sobre agar (del inglés <i>Spot-On-Agar Test</i>)
SRP	Partícula reconocedora de señal (del inglés <i>Signal Recognition Particle</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
TMD	Dominios transmembrana (del inglés <i>Transmembrane Domains</i>)
TMS	Segmentos transmembrana (del inglés <i>Transmembrane Segment</i>)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral (del inglés <i>Tumoral Necrosis Factor</i>)
TPI	Promotor TPI (del inglés <i>Triose Phosphate Isomerase</i>)

UBA	Medio de cultivo UBA (del inglés <i>Universal Beer Agar</i>)
UP	Unidad de pasteurización
VLB S7-7	Medio de cultivo VLB S7-7 (del alemán <i>Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei</i>)
VRE	Enterococos resistentes a la vancomicina (del inglés <i>Vancomycin Resistant Enterococci</i>)
WA	Medio de cultivo WA (del inglés <i>Wort-Agar</i>)
WLN	Medio de cultivo WLN (del inglés <i>Wallerstein Laboratory Nutrient</i>)
X-Gal	Del inglés <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>
YPD	Medio de cultivo para el crecimiento de levaduras
YPGR	Medio de cultivo YPD suplementado con galactosa y rafinosa, y sin glucosa
Zeo	Zeocina
vol/vol	Relación v/v
wt/vol	Relación m/v

2. ABREVIATURAS DE UNIDADES

Da	Dalton
hl	Hectolitros
kb	Kilobase
kg	Kilogramo
kDa	Kilodalton
l	Litros
mg	Miligramos
ng	Nanogramos
pb/bp	Par de bases
ppm	Partes por millón
UA	Unidad arbitraria
UB/BU	Unidad de bacteriocina
ufc/cfu	Unidad formadora de colonia

3. ABREVIATURAS DE GÉNEROS MICROBIANOS

B.	<i>Bacillus</i> spp.
C.	<i>Carnobacterium</i> spp.
Cl.	<i>Clostridium</i> spp.
E.	<i>Enterococcus</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Escherichia</i> spp., por ej.: <i>E. coli</i>)
H.	<i>Helicobacter</i> spp.
Ho.	<i>Hordeum</i> spp.
L.	<i>Listeria</i> spp.
Lb.	<i>Lactobacillus</i> spp.
Lc.	<i>Lactococcus</i> spp.
Le.	<i>Leuconostoc</i> spp.
O.	<i>Obesumbacterium</i> spp.
P.	<i>Pediococcus</i> spp. (en ocasiones se refiere a <i>Pectinatus</i> spp., por ej.: <i>P. frisingensis</i>)
Pc.	<i>Pichia</i> spp.
Pr.	<i>Propionibacterium</i> spp.
Ps.	<i>Pseudomona</i> spp.
R.	<i>Rhizopus</i> spp.
S.	<i>Staphylococcus</i> spp.
Sa.	<i>Salmonella</i> spp.
Sc.	<i>Saccharomyces</i> spp.
St.	<i>Streptococcus</i> spp.
Z.	<i>Zymomonas</i> spp.

4. ABREVIATURAS DE NUCLEÓTIDOS

A (AMP)	Adenina monofosfato o ácido adenílico
C (CMP)	Citosina monofostato o ácido citidílico
G (GMP)	Guanosina monofosfato o ácido guanidílico
T (TMP)	Timidina monofosfato o ácido timidílico
U (UMP)	Uridina monofosfato o ácido uridílico

5. ABREVIATURAS Y MASA MOLECULAR DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviaturas		Masa molecular (Da)
No modificados postraducionalmente			
Ácido aspártico	Asp	D	133
Ácido glutámico	Glu	E	147
Alanina	Ala	A	89
Arginina	Arg	R	174
Asparagina	Asn	N	132
Cisteína	Cys	C	121
Fenilalanina	Phe	F	165
Glicina	Gly	G	75
Glutamina	Gln	Q	146
Histidina	His	H	155
Isoleucina	Ile	I	131
Leucina	Leu	L	131
Lisina	Lys	K	146
Metionina	Met	M	149
Prolina	Pro	P	115
Serina	Ser	S	105
Tirosina	Tyr	Y	181
Treonina	Thr	T	119
Triptófano	Trp	W	204
Valina	Val	V	117
Modificados postraducionalmente			
Dehidroalanina	Dha	-	
Dehidrobutirina	Dhb	-	
Lantionina	Lan	-	
β-metil-lantionina	MeLan	-	

APÉNDICE 2. CÓDIGO GENÉTICO

U		C		A		G	
Primera posición (extremo 5')	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U	
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys		C
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } *	UGA } *		
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } *	UGG } Trp		
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U	
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg		C
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg		
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg		
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U	
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser		C
		AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg		
		AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg		
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U		
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly		C	
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly			
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly			
Tercera posición (extremo 3')							

*Los codones de terminación de la traducción se indican con un asterisco.

APÉNDICE 3. LISTADO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y SECUENCIAS DIANA ESPECÍFICAS

Enzima	Secuencia diana ^a
<i>Hind</i> III	A [▼] AGCTT TTCGA [▲] A
<i>Sac</i> I	GAGCT [▼] C C [▲] TCGAG
<i>Sal</i> I	G [▼] TCGAC CAGCT [▲] G
<i>Sma</i> I	CCC [▼] GGG GGG [▲] CCC
<i>Xba</i> I	T [▼] CTAGA AGATC [▲] T
<i>Xho</i> I	C [▼] TCGAG GAGCT [▲] C

^aEl sitio de restricción se indica con el símbolo ▼.

APÉNDICE 4. GLOSARIO

Aditivos	Sustancias que se añaden intencionadamente a los productos alimenticios, sin propósito de cambiar su valor nutritivo y con la finalidad de modificar sus caracteres, técnicas de elaboración, conservación y/o para mejorar su adaptación al empleo que se destinan. Dichas sustancias, posean o no valor nutritivo, no se consumen normalmente como alimentos, ni se usan como ingredientes característicos de los mismos.
Adjuntos	Materias primas que sustituyen parcialmente a la malta o al extracto de malta en la elaboración de cerveza.
ADN complementario	ADN monocatenario sintetizado <i>in vitro</i> a partir de un molde de ARNm empleando una ADN polimerasa ARN-dependiente.
ADN polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN mediante la adición de desoxinucleótidos trifosfato en sentido 5'-3' a un cebador de ARN o ADN utilizando como molde una cadena de ADN complementario.
Agrupación génica	Conjunto de operones cuyos productos génicos intervienen en la misma función biológica.
ATPasa	Enzima que cataliza la hidrólisis de la adenosina trifosfato (ATP), liberando adenosina difosfato y fosfato inorgánico.
Bacteriocina	Péptidos o proteínas de síntesis ribosomal, con o sin modificaciones postraduccionales, producidos y secretados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, que poseen actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática).
Bacteriocinogenicidad	Capacidad de producir bacteriocinas.
Bioconservación	Técnica de conservación de los alimentos definida como “la prolongación de la vida útil e incremento de la seguridad higiénico-sanitaria de los alimentos mediante la utilización de compuestos naturales de origen animal, vegetal o microbiano que no ejercen efectos perjudiciales para la salud de los consumidores”.
Cebada	La cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) es una planta monocotiledónea anual perteneciente a la familia de las gramíneas, y es un cereal de gran importancia tanto para animales como para humanos y, actualmente, el quinto cereal más cultivado en el mundo.
Cebador	Oligonucleótido empleado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
Cerveza	Bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levadura seleccionada (<i>Saccharomyces</i> spp.), de un mosto procedente de malta de cebada, solo o mezclado con otros productos amiláceos transformables en azúcar por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción.
Cerveza de bajo contenido en alcohol	Cervezas cuya graduación alcohólica está comprendida entre el 1 y el 3 por 100 en volumen, incluido en dicho porcentaje la tolerancia admitida para la indicación del grado alcohólico volumétrico.

Cerveza sin alcohol	Cervezas cuya graduación alcohólica es menor al 1 por 100 en volumen, incluido en dicho porcentaje la tolerancia admitida para la indicación del grado alcohólico volumétrico.
Colicina	Bacteriocina producida por <i>Escherichia coli</i> cuyo tamaño molecular es de 25–80 kDa.
Compuestos ionóforos	Compuestos hidrofóbicos que se introducen en la membrana celular y aumentan la permeabilidad a ciertos iones.
Conjugación	Proceso de transferencia de moléculas de ADN plasmídico de una célula bacteriana a otra.
Cultivo adjunto	Preparación de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial con una finalidad distinta a la de los cultivos iniciadores y protectores (acelerar la maduración y producir el sabor/aroma deseado).
Cultivo iniciador	Preparación de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial para modificar, mejorar y estandarizar sus características organolépticas y reológicas.
Cultivo probiótico	Cultivos mixtos o monoespecíficos de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras), y componentes de las células microbianas que ejercen efectos beneficiosos en la salud y en el bienestar del hospedador, en algunos casos como consecuencia de la mejora de las propiedades de su microflora indígena.
Cultivo protector	Preparación de microorganismos vivos (bacterias, hongos y/o levaduras) que se adicionan a la materia prima durante el proceso de elaboración de alimentos mediante la tecnología de la fermentación industrial para asegurar su calidad higiénico-sanitaria y seguridad e incrementar su vida útil mediante la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes.
Dominio	Región de una molécula de proteína o ADN que posee una función o conformación específica.
Efecto sinérgico	Se produce cuando la utilización combinada (ratio 1:1) de dos bacteriocinas permite obtener una actividad antimicrobiana mayor que la correspondiente al efecto aditivo de las bacteriocinas evaluadas independientemente.
Enfermedad sarcina	Alteración de la cerveza producida por microorganismos del género <i>Pediococcus</i> , caracterizada por un exceso de acidez, turbidez sedosa, sedimento granular, filamentosidad y aparición de sabores y aromas anómalos debido a la producción de diacetilo y 2,3-butanodiol.
Episoma	Elemento genético bacteriano que puede replicarse independientemente del cromosoma bacteriano o integrarse y replicarse como parte del cromosoma.
Expresión génica	Proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

Extensión N-terminal	Extensión de 15–30 aminoácidos localizada en la región N-terminal de las proteínas recién sintetizadas que será eliminada durante o tras el proceso de secreción de la proteína a través de la membrana citoplasmática.
Factor de virulencia	Molécula efectora que potencia la capacidad de un microorganismo de causar enfermedad.
Fermentación alcohólica	Proceso anaeróbico realizado por las levaduras básicamente, aunque también lo pueden realizar algunas bacterias, de la que se obtienen muchos productos como vino, cerveza, alcohol, chocolate, pan, etc.
Feromona	Sustancia pseudohormonal secretada por un organismo a modo de señal específica para otro organismo, generalmente de la misma especie.
Feromona sexual	Feromona secretada por células bacterianas cuya actividad biológica es el desencadenamiento del proceso de conjugación plasmídica.
Floculación	Habilidad de las levaduras para adherirse en flóculos y sedimentar rápidamente en el medio en que estén suspendidas.
Flora NSLAB	Conjunto de microorganismos pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas que no forman parte del cultivo iniciador empleado durante la elaboración del alimento.
Fuerza protón motriz	Gradiente electroquímico transmembrana necesario para el desarrollo de los procesos metabólicos dependientes de energía.
Gen	Segmento de ADN que codifica un péptido, una proteína o una molécula de ARN.
Guarda	Proceso de maduración del aroma y sabor de la cerveza.
Humulonas (α-ácidos)	Componentes del lúpulo responsables de proporcionar el sabor amargo típico de la cerveza.
Levaduras	Hongos, generalmente unicelulares, que se reproducen vegetativamente por gemación. <i>Saccharomyces</i> es uno de los aproximadamente 40 géneros de levaduras ascoporógenas que se conocen, en el que se incluyen siete especies, entre las que se encuentran las levaduras más habitualmente utilizadas en la industria alimentaria.
Levaduras salvajes	Levaduras que, no siendo las cepas de la levadura cervecera o de siembra, se encuentran o se aíslan en el proceso de cervecería, principalmente durante la fermentación y en la cerveza terminada.
Lúpulo	El lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>) es una planta trepadora perenne perteneciente a de la familia de las <i>Cannabinaceas</i> , cuyas flores femeninas desecadas se emplean para aromatizar y dar sabor amargo a la cerveza.
Maceración	Etapas del proceso de elaboración de la cerveza cuyo objetivo es la obtención de un líquido o extracto, a partir de la malta y de otros adjuntos, que posea la mayor cantidad posible de sustancias solubles en agua (por ej.: azúcares, aminoácidos, proteínas) y que pueda servir finalmente para la obtención, mediante fermentación con levadura cervecera, de un líquido alcohólico con un perfil organoléptico específico.

Malta	Producto de la transformación de los granos de cebada que se obtiene mediante tres procesos básicos remojo, germinación y secado. A este proceso se le denomina malteado.
Metabolito primario	Producto del metabolismo bacteriano generado durante la fase exponencial de crecimiento.
Metabolito secundario	Producto del metabolismo bacteriano, no esencial para el crecimiento o el mantenimiento de las funciones celulares, generado durante la fase estacionaria de crecimiento.
Microcina	Bacteriocina producida por <i>E. coli</i> , cuyo tamaño molecular es <10 kDa.
Molécula <i>docking</i>	Molécula que facilita la interacción de las bacteriocinas con sus diana(s) celular(es).
Mosto cervecero	Solución en agua potable de carbohidratos, proteínas y sales minerales resultantes de la degradación enzimática de la malta, con o sin adjuntos cerveceros, realizada mediante procesos tecnológicos adecuados.
Número de copias	Número de repeticiones de un determinado plásmido que contiene una célula bacteriana.
Operón	Conjunto de genes transcritos bajo el control de un único promotor, cuyos productos intervienen en la misma función biológica.
Péptido señal	Extensión N-terminal de las proteínas recién sintetizadas reconocida por el sistema Sec o Ruta General de Secreción.
Piocina	Bacteriocina producida por <i>Pseudomonas</i> spp.
Preprobacteriocina	Precursor de la bacteriocina biológicamente inactivo constituido por un propéptido C-terminal (probacteriocina) y una extensión N-terminal (secuencia líder o péptido señal).
Probacteriocina	Forma de la bacteriocina en la que, en su caso, se ha eliminado la extensión N-terminal implicada en su secreción, pero que aún no ha sufrido las modificaciones postraduccionales que darán lugar a la bacteriocina madura.
Proteína chaperona	Conjunto de proteínas presentes en todas las células cuya función es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas recién formadas. Estas chaperonas no forman parte de la estructura primaria de la proteína funcional, sino que sólo se unen a ella para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y transporte celular a otra parte de la célula donde la proteína realiza su función.
Replicón	Molécula de ADN capaz de replicarse independientemente. Región de ADN plasmídico (<3 kb) que incluye los genes y las secuencias necesarias para la replicación plasmídica y su control.
Respuesta SOS	Síntesis de una serie de proteínas implicadas en la reparación, recombinación y replicación del ADN que se produce en células bacterianas cuyo ADN ha sufrido graves daños (por ej.: exposición a luz ultravioleta).
Secuencia -10	Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 10 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TATAAT.

Secuencia –35	Secuencia de la región promotora de un gen situada aproximadamente 35 pb delante del codón de iniciación de un gen, cuya secuencia consenso es TTGACA.
Secuencia consenso	Segmento de un gen/proteína que es compartido por un gran número de miembros de una familia génica/proteica, cuya secuencia representa los residuos nucleotídicos/aminoácidos encontrados más frecuentemente en cada posición (residuos conservados).
Sistema de secreción del tipo ABC	Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo secuencia líder en el que participan una proteína transportadora del tipo ABC y una proteína accesoria, dedicados específicamente a la secreción de una sustancia determinada.
Sistema de secreción Sec-dependiente	Sistema de secreción de péptidos sintetizados con una extensión N-terminal del tipo péptido señal en el que participan los productos de los genes Sec y las peptidasas señal encargadas del procesamiento del prepropéptido.
Sustancia nutracéutica	Componente de los alimentos que posee efectos beneficiosos para la salud del consumidor.
Traducción	Proceso de síntesis de una proteína a partir de una molécula de ARNm (que contiene la información genética necesaria para codificar una o varias proteínas mediante su traducción a producto génico en los ribosomas).
Transcripción	Proceso de síntesis de una molécula de ARNm a partir del ADN.
Transformación	Proceso de asimilación de moléculas de ADN por una célula bacteriana.
Transportador del tipo ABC	Homodímero de proteína(s) (aprox. 700 aa) que contiene: (i) un dominio C-terminal o de unión al ATP con actividad ATPasa, que contienen los motivos Walker A y Walker B, el motivo C y la región de cambio, y (ii) un dominio central integral de membrana, que contiene 4–6 segmentos transmembrana. En la mayoría de los transportadores del tipo ABC dedicados al transporte de bacteriocinas existe un dominio adicional o dominio N-terminal con actividad proteolítica, que contiene dos secuencias conservadas denominadas dominio cisteína y dominio histidina.
Transposón	Elemento genético móvil o secuencia de ADN con capacidad de desplazarse (transponerse) de un lugar del ADN a otro.
Unidad arbitraria	Unidad empleada para la cuantificación de la actividad antimicrobiana empleando la prueba ADT que se define como “el recíproco de la máxima dilución de una muestra que inhibe al microorganismo indicador inoculado en una placa de agar produciendo la aparición de un halo o zona de inhibición”.
Unidad de bacteriocina	Unidad empleada para la cuantificación de la actividad antimicrobiana empleando la prueba MPA que se define como “el recíproco de la máxima dilución de una muestra que inhibe en un 50% el crecimiento del microorganismo indicador inoculado en una placa microtituladora”.
Vector	Molécula de ADN de pequeño tamaño molecular con capacidad de replicarse, en la que se inserta un fragmento de ADN exógeno objeto de estudio (por ej.: plásmidos).

APÉNDICE 5. LISTADO DE TABLAS

Capítulo II

Tabla II.1.	Aditivos empleados durante la elaboración de la cerveza	35
Tabla II.2.	Principales enzimas que actúan durante la maceración de la malta	39
Tabla II.3.	Principales cervezas elaboradas en Europa	45
Tabla II.4.	Características principales de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram- negativas y Gram-positivas	65
Tabla II.5.	Diferencias principales entre las bacteriocinas y los antibióticos	68
Tabla II.6.	Microorganismos adicionados durante las fermentaciones industriales como cultivos iniciadores, protectores y/o adjuntos	76
Tabla II.7.	Clasificación de las bacteriocinas de las bacterias lácticas	82
Tabla II.8.	Especies incluidas en el género <i>Enterococcus</i>	112
Tabla II.9.	Principales factores potenciales de virulencia identificados en microorganismos del género <i>Enterococcus</i>	116
Tabla II.10.	Aplicaciones de los enterococos bacteriocinogénicos como cultivos iniciadores, adjuntos y/o protectores de los alimentos	124
Tabla II.11.	Bacteriocinas producidas por <i>Enterococcus</i> spp.	128
Tabla II.12.	Aplicaciones potenciales de las enterocinas como aditivos alimentarios	131
Tabla II.13.	Características principales de las enterocinas producidas por <i>E. faecium</i> L50	131
Tabla II.14.	Especies bacterianas incluidas en el espectro de acción antimicrobiana de <i>E. faecium</i> L50	132
Tabla II.15.	Principales diferencias entre el sistema Sec de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas	147
Tabla II.16.	Bacteriocinas de bacterias lácticas producidas heterológamente por levaduras	155

Capítulo III/Chapter III

Table III.1.	<i>Bacteriocinogenic and indicator microorganisms used in this study</i>	163
Table III.2.	<i>Antimicrobial activity of bacteriocinogenic LAB against beer-spoilage LAB</i>	168
Table III.3.	<i>Bacteriocin cross-sensitivity of the wild-type strain P. damnosus CECT4797 (EntL50^s–EntP^s–EntQ^r, NisA^s, PedPA-I^s) and its derived PedPA-I-resistant, NisA-resistant, and E. faecium L50 bacteriocins-resistant mutants</i>	170
Table III.4.	<i>Antimicrobial activity of E. faecium L50 and its bacteriocin-deficient mutants E. faecium L50/30-2 and E. faecium L50/14-2 grown at 32°C and 42°C in MRS broth, and chemically synthesized EntQ against selected indicator microorganisms</i>	170
Table III.5.	<i>Antimicrobial activity and synergistic antimicrobial activity of in vitro-synthesized EntL50A and EntL50B</i>	171
Table III.6.	<i>Stability of EntL50 (EntL50A and EntL50B) during varying exposures of 20-fold concentrated supernatant from E. faecium L50 diluted in wort (hopped and unhopped)</i>	

<i>and alcoholic (5% ethanol, vol/vol) lager beer to different temperatures, and after long-term storage at 8°C and 25°C</i>	179
--	-----

Capítulo IV/Chapter IV

Table IV.1. <i>Microorganisms and plasmids used in this study</i>	198
Table IV.2. <i>Primers and PCR products used in this study</i>	200
Table IV.3. <i>Production and antimicrobial activity of recombinant EntL50A and EntL50B from Sc. cerevisiae-L50A-20 (pYABD02) and Sc. cerevisiae-L50B-4 (pYABD03) cultures, respectively, grown in the minimal medium SCGR at 30°C</i>	209
Table IV.4. <i>Purification of recombinant EntL50A and EntL50B produced by Sc. cerevisiae-L50A-20 (pYABD02) and Sc. cerevisiae-L50B-4 (pYABD03), respectively, grown in SCGR at 30°C</i>	214

Capítulo V/Chapter V

Table V.1. <i>Microorganisms and plasmids used in this study</i>	238
Table V.2. <i>Primers and PCR products used in this study</i>	240
Table V.3. <i>Production and antimicrobial activity of EntL50A and/or EntL50B from Pc. pastoris X-33A-22 (pBAS01), Pc. pastoris X-33B-33 (pBAS02) and Pc. pastoris X-33AB-27 (pBAS03) recombinant strains, respectively, grown in the minimal and complex mediums BMM and BMMY, respectively</i>	247
Table V.4. <i>Purification of recombinant EntL50A and EntL50B produced by Pc. pastoris X-33A-22 (pBAS01) and Pc. pastoris X33B-33 (pBAS02), respectively, grown in BMMY at 30°C</i>	251

Capítulo VI

Tabla VI.1. <i>Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas bacteriocinogénicas de origen alimentario frente a bacterias lácticas alterantes de la cerveza</i>	273
Tabla VI.2. <i>Susceptibilidad de E. faecium L50 a diversos antibióticos y criterios de sensibilidad/resistencia de Enterococcus spp.</i>	277
Tabla VI.3. <i>Crecimiento, acidificación y actividad antimicrobiana de E. faecium L50 desarrollado en diversos sustratos cerveceros y caldo MRS</i>	280
Tabla VI.4. <i>Máxima producción y actividad antimicrobiana de EntL50A y EntL50B expresadas y secretadas por levaduras recombinantes de Sc. cerevisiae y Pc. pastoris</i>	307

Apéndices

Apéndice 1.5. <i>Abreviaturas y masa molecular de aminoácidos</i>	378
Apéndice 2. <i>Código genético</i>	379
Apéndice 3. <i>Listado de enzimas de restricción y secuencias diana específicas</i>	379

APÉNDICE 6. LISTADO DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 2.1.	Consumo per cápita de cerveza (litros) en la UE	25
Figura 2.2.	Esquema general del proceso de elaboración de la cerveza	36
Figura 2.3.	Modelos que explican la formación de poros por las bacteriocinas	89
Figura 2.4.	Principales modos de acción propuestos para las bacteriocinas: (i) formación de poros en la membrana, mediada o no por una molécula <i>docking</i> (1a y 1b, respectivamente); (ii) inhibición de la síntesis de la pared celular (2) e (iii) hidrólisis de la pared celular (3)	90
Figura 2.5.	Representación esquemática de las agrupaciones génicas implicadas en la síntesis de bacteriocinas de la clase II	91
Figura 2.6.	(A) Alineamiento de las secuencias de los dos péptidos del sistema de EntL50 (EntL50A y EntL50B). (B) Alineamiento de las secuencias de los dos péptidos de los sistemas de EntL50 (EntL50A y EntL50B) y EntMR10 (EntMR10A y EntMR10B). (C) Alineamiento de las secuencias de EntL50A y EntRJ-11. (D) Alineamiento de las secuencias de EntL50B y EntJS	133
Figura 2.7.	Representación esquemática de la organización genética de una región de 21.446 pb del plásmido pCIZ1 de <i>E. faecium</i> L50	135
Figura 2.8.	Mapa genético del plásmido pCIZ2 de <i>E. faecium</i> L50	138
Figura 2.9.	Representación esquemática de un sistema de secreción clásico en bacterias Gram-negativas (A) y Gram-positivas (B)	141
Figura 2.10.	Secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas mediante el sistema Sec	145
Figura 2.11.	(A) Mecanismo de procesamiento, transporte y secreción de proteínas en levaduras. (B) Reconocimiento del SP y lugar de procesamiento de MF α 1 de <i>Sc. cerevisiae</i>	149

Capítulo III/Chapter III

Figure 3.1.	<i>Bacteriocin cross-sensitivity of the wild-type strain P. damnosus CECT4797 (EntL50^s–EntP^s–EntQ^r, NisA^s, PedPA-I^s) (1) and its derived PedPA-I-resistant (2), NisA-resistant (3), and E. faecium L50 bacteriocins-resistant (4) mutants to PedPA-I, NisA and E. faecium L50 bacteriocins as determined by and ADT</i>	169
Figure 3.2.	<i>Antimicrobial activity of in vitro-synthesized EntL50A and EntL50B, and in vitro-cosynthesized EntL50A and EntL50B (EntL50AB) against P. damnosus CECT4797 as determined by a SPAT</i>	171
Figure 3.3.	<i>Growth (■), acidification (▲) and antimicrobial activity (●) of E. faecium L50 bacteriocins in MRS broth (A), unhopped wort (B), and unhopped wort supplemented with 12.5 (C), 25 (D) and 50% (wt/vol) (E) of MRS broth at 32°C</i>	173
Figure 3.4.	<i>Effect of E. faecium L50 bacteriocins on Lb. brevis NFBC108 (5×10⁵ CFU/ml [A] and 2×10³ CFU/ml [B]), and P. damnosus CECT4797 (3×10⁵ CFU/ml [C] and 3×10³ CFU/ml [D]) grown in MRS broth at 32°C</i>	174

Figure 3.5.	<i>Effect of E. faecium L50 bacteriocins on Lb. brevis NFBC108 ($4-5 \times 10^5$ CFU/ml) grown in hopped wort (A), and unhopped wort (B) at 32°C</i>	176
Figure 3.6.	<i>Effect of E. faecium L50 bacteriocins on Lb. brevis NFBC108 (4×10^5 CFU/ml) grown in alcoholic lager beers (5% ethanol, vol/vol [A]; 1% ethanol, vol/vol [B]) and non-alcoholic lager beer (C) at 32°C</i>	177
Figure 3.7.	<i>Stability of EntL50 (EntL50A and EntL50B) during varying exposures of CS from E. faecium L50 diluted in wort (hopped and unhopped) and alcoholic (5% ethanol, vo/vol) lager beer to different temperatures and long-term storage at 8 and 25°C</i>	178

Capítulo IV/Chapter IV

Figure 4.1.	<i>Construction of the Sc. cerevisiae protein expression and secretion vector pYABD01, derived from pPICZαA and pYES2, containing MFα1_s including the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site under control of P_{GALI}. (B) Construction of the recombinant plasmids pYABD02, pYABD03 and pYABD04, derived from pYABD01, containing MFα1_s fused in frame to entL50A and/or entL50B structural genes.</i>	201
Figure 4.2.	<i>Antimicrobial activity of CS from Sc. cerevisiae L50A-20 (pYABD02) and Sc. cerevisiae L50B-4 (pYABD03) cultures grown in SCGR (A and B, respectively) and YPGR (C and D, respectively) broth at 30°C (CS) against P. damnosus CECT4797 by an ADT.</i>	210
Figure 4.3.	<i>Antimicrobial activity of supernatants from a co-culture of Sc. cerevisiae L50A-20 (pYABD02) and Sc. cerevisiae L50B-4 (pYABD03) grown in SCGR broth at 30°C against P. damnosus CECT4797 by an ADT</i>	212
Figure 4.4.	<i>Antimicrobial activity of supernatants from Sc. cerevisiae L50A-20 (pYABD02) (EntL50A) and Sc. cerevisiae L50B-4 (pYABD03) (EntL50B) cultures grown in SCGR broth at 30°C, independently and combined to achieve a 1:1 bacteriocin ratio (EntL50A+EntL50B), against P. damnosus CECT4797 as determined by a SPAT</i>	212
Figure 4.5.	<i>Mass spectrometry analysis of recombinant EntL50A (A) and EntL50B (B) purified from Sc. cerevisiae L50A-20 (pYABD02) and Sc. cerevisiae L50B-4 (pYABD03) cultures, respectively, grown in SCGR broth at 30°C</i>	215
Figure 4.6.	<i>(A) Tricine-SDS-PAGE of purified EntL50A and EntL50B heterologously produced by Sc. cerevisiae L50A-20 (pYABD02) and Sc. cerevisiae L50B-4 (pYABD03), respectively, after silver staining. (B) Western blotting using rabbit polyclonal antibodies with specificity for EntL50A (anti-LR1-KLH) and EntL50B (anti-LR2-KLH). (C) Antimicrobial activity after gel overlay with the indicator strain P. damnosus CECT4797</i>	215

Capítulo V/Chapter V

Figure 5.1.	<i>Construction of the recombinant plasmids pBAS01, pBAS02 and pBAS03, derived from the Pc. pastoris expression and secretion vector pPICZαA, containing MFα1_s including the nucleotides encoding the Kex2 signal cleavage site fused in frame to entL50A and/or entL50B structural genes, and under control of P_{AOX1}</i>	241
Figure 5.2.	<i>Direct antimicrobial activity of Pc. pastoris X-33A-22 (pBAS01) (spot A), Pc. pastoris X-33B-33 (pBAS02) (spot B), Pc. pastoris X-33AB-27 (pBAS03) (spot C), and Pc. pastoris X-33C (pPICZαA) (spot D), grown in BMMY broth at 30°C after five days of incubation, as determined by a SPAT using P. damnosus CECT4797 as indicator microorganism</i>	245

Figure 5.3.	<i>Antimicrobial activity of supernatants from Pc. pastoris X-33A-22 (pBAS01), Pc. pastoris X-33B-33 (pBAS02), and Pc. pastoris X-33AB-27 (pBAS03) cultures grown in BMM (A1, B1 and C1, respectively) and BMMY (A2, B2 and C2, respectively) broth at 30°C against P. damnosus CECT4797 as determined by an ADT</i>	248
Figure 5.4.	<i>Mass spectrometry analysis of recombinant EntL50A (A) and EntL50B (B) purified from Pc. pastoris X-33A-22 (pBAS01) and Pc. pastoris X-33B-33 (pBAS02) cultures, respectively, grown in BMMY broth at 30°C</i>	252
Figure 5.5.	<i>(A) Tricine-SDS-PAGE of purified EntL50A and EntL50B heterologously produced by Pc. pastoris X-33A-22 (pBAS01) and Pc. pastoris X-33B-33 (pBAS02), respectively, after silver staining. (B) Western blotting using rabbit polyclonal antibodies with specificity for EntL50A (anti-LR1-KLH) and EntL50B (anti-LR2-KLH). (C) Antimicrobial activity after gel overlay with the indicator strain P. damnosus CECT4797</i>	252
 Capítulo VI		
Figura 6.1.	<i>Mapa genético del vector de expresión de Sc. cerevisiae pYES-2 (A) y del vector de expresión y secreción de Pc. pastoris pPICZαA (B)</i>	288
Figura 6.2.	<i>Mapa genético del vector de expresión y secreción de proteínas pYABD01 (6.101 pb) para Sc. cerevisiae</i>	289
Figura 6.3.	<i>Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos recombinantes pYABD01 (1), pYABD02 (2), pYABD03 (3) y pYABD04 (4)</i>	290
Figura 6.4.	<i>Actividad antimicrobiana máxima de los sobrenadantes de los cultivos de las levaduras recombinantes Sc. cerevisiae L50A-20 (pYABD02) (A), Sc. cerevisiae L50B-4 (pYABD03) (B), Pc. pastoris X-33A-22 (pBAS01) (C) y Pc. pastoris X-33B-33 (pBAS02) (D) desarrollados en los medios SCGR (A y B), BMM (C) y BMMY (D) a 30°C</i>	307

